

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 8 月 5 日 (05.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/065599 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C07K
16/28, C12N 5/08, C12P 21/08, C12Q 1/68, 1/02, G01N
33/50, 33/53, A61P 25/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000629

(22) 国際出願日: 2004 年 1 月 23 日 (23.01.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-016790 2003 年 1 月 24 日 (24.01.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザ
イ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東
京都文京区小石川 4 丁目 6 番 10 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾野 雄一

(ONO, Yuichi) [JP/JP]; 〒5670045 大阪府茨木市紫
明園 1-43-604 Osaka (JP). 中川 康子 (NAKAGAWA,
Yasuko) [JP/JP]; 〒6060806 京都府京都市左京区下
鴨藪倉町 19-3 Kyoto (JP). 坂本 佳正 (SAKAMOTO,
Yoshimasa) [JP/JP]; 〒5690802 大阪府高槻市北園町
2-22 Osaka (JP). 水原 英理 (MIZUHARA, Eri) [JP/JP];
〒6391054 奈良県大和郡山市新町 305-7 Nara (JP). 中
谷 智哉 (NAKATANI, Tomoya) [JP/JP]; 〒6008385 京
都府京都市下京区高辻通大宮東入五坊大宮町 90 真
徳ハイ ツ 507 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: Lrp4/CORIN DOPAMINE-PRODUCING NEURON PROLIFERATION PRECURSOR CELL MARKER

(54) 発明の名称: Lrp4/Corin ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカー

(57) Abstract: In nerve cell transplantation therapy, it seems preferable from the standpoint of safety to employ cells of a desired cell species alone. Considering the risk for oncogenesis, it also seems preferable to employ nerve cells after the completion of cell division. Considering survival in the host after the transplantation, ability to form proper network, etc., moreover, it seems that the therapeutic effect might be enhanced by using precursor cells at an earlier stage. A gene Lrp4 expressed specifically in dopamine-producing neuron proliferation precursor cells before the completion of cell division is identified. By using the expression of the Lrp4 in cells as an indication, it becomes possible to select cells which are appropriately usable, from the standpoints of safety, survival ratio and the ability to form network, in transplantation therapy for neurodegenerative diseases including Parkinson's disease.

(57) 要約:

神経細胞移植治療においては、安全性の面では目的の細胞種のみからなる細胞群、そして腫瘍形成の危険性を考慮すれば分裂停止後の神経細胞が好ましいと考えられる。さらに、移植先での生存、正しいネットワーク形成能等を考慮するとより早期の前駆細胞により治療効果が増大されると期待される。

本発明により、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的に発現する遺伝子 Lrp4 が同定された。細胞における該 Lrp4 の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となる。

WO 2004/065599 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

Lrp4/Corin ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカー

5 技術分野

分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞 (progenitor) において発現している遺伝子として Lrp4 を同定した。該遺伝子の発現、または該遺伝子によりコードされる膜貫通蛋白質の発現を検出することにより、パーキンソン病 (PD) 等の神経変性疾患の移植治療において用いることができるドーパミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することができる。

背景技術

ドーパミン系は、哺乳動物の脳において重要な運動調節、ホルモン分泌調節、情動調節等に関与する非常に重要な系である。従って、ドーパミン作動性神経伝達における異常は、様々な神経系の障害を引き起こす。例えば、パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質のドーパミン産生ニューロンの特異的な脱落が原因で起こる錐体外路系の神経変性疾患である (HARRISON' S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 第2巻 第23版, Isselbacher et al. 編, McGraw-Hill Inc., NY (1994) pp. 227 5-7)。パーキンソン病の治療法としては、産生されるドーパミン量の低下を補うために L-DOPA (3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン) を経口投与する方法が主に採られているが、効果の持続性が良くないことが知られている。

パーキンソン病治療において、最近では失われたドーパミン産生ニューロンを補うために、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む 6~9 週齢の中絶胎児の中脳腹側領域を移植する治療法も試みられている (米国特許第 5690927 号; Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8; Freed et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1549-55; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 155

6-63; Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24; Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50; Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80)。しかし、現在のところ、この方法では細胞の供給面、倫理面(Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106; Turner et al. (1993) Neurosurg. 33: 1031-7)で問題があると共に、感染汚染の危険性、免疫学的な移植片拒絶(Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80; Widner and Brudin (1988) Brain Res. Rev. 13: 287-324)、胎児組織が糖分解よりも脂質代謝に主に依存しているための生存率の低さ(Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106)等の様々な面で問題が指摘されている。

- 10 倫理面や供給不足の問題を解決するために、例えばブタ由来の皮質、線条、及び中脳細胞を用いる方法も提案されている(例えば、特表平 10-508487 号公報; 特表平 10-508488 号公報; 特表平 10-509034 号公報参照)。この方法においては、拒絶反応を抑制するため、細胞表面上の抗原(MHC クラス I 抗原)を改変するという煩雑な操作が必要とされる。移植片拒絶を解消する方法としては、例えば、セル
- 15 トーリ細胞を同時に移植することにより、局在的に免疫抑制する方法も提案されている(特表平 11-509170 号公報; 特表平 11-501818 号公報; Selawry and Cameron (1993) Cell Transplant 2: 123-9)。MHC がマッチする血縁者、他人の骨髄、骨髄バンク、及び臍帯血バンク等から移植細胞を得ることも可能であるが、患者自身の細胞を用いることができれば、余計な操作や手間なしに拒絶反応の問題も
- 20 解決することができる。

そこで、中絶胎児由来の細胞に代えて、胚性幹細胞(ES)細胞、骨髄間質細胞などの非神経系細胞からの in vitro におけるドーパミン産生ニューロンの分化系の移植材料としての利用が有望視されている。実際、ラットパーキンソン病モデルの病変線条への ES 細胞移植により機能的なドーパミン産生ニューロンが形成

25 されたとの報告もある (Kim et al (2002) Nature 418: 50-56)。将来的には ES 細胞若しくは患者本人の持つ神経幹細胞からの再生治療の重要性が増してくる

ものと思われる。

神経組織の損傷の治療においては脳機能の再構築が必要となり、周囲の細胞と適切なリンクを形成する（ネットワーク形成）ために成熟した細胞ではなくニューロンへと *in vivo* において分化し得る細胞を移植する必要がある。ニューロン

- 5 前駆細胞の移植において上述した供給面以外で問題となるのは、前駆細胞が不均一な細胞集団へと分化する可能性がある点である。例えば、パーキンソン病の治療においては、カテコールアミン含有ニューロンの中でもドーパミン産生ニューロンを選択的に移植することが必要である。これまで、パーキンソン病の治療に用いることが提案されている移植細胞としては、線条体(Lindvall et al. (198
- 10 9) Arch. Neurol. 46: 615-31 ; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63)、ヒト胎児神経由来の不死化セルライン(特表平 8-509215 号公報 ; 特表平 11-506930 号公報 ; 特表 2002-522070 号公報)、NT2Z 細胞の有糸分裂後ヒトニューロン(特表平 9-5050554 号公報)、ニューロン始原細胞(特表平 11-509729 号公報)、ドーパミン等のカテコールアミンを産生するように外来遺伝子によりト
- 15 ランスフェクトされた細胞、骨髄ストロマ細胞(特表 2002-504503 号公報 ; 特表 2002-513545 号公報)、遺伝子改変された ES 細胞 (Kim et al (2002) Nature 418: 50-56) 等が挙げられる。しかしながらいずれも、ドーパミン産生ニューロンまたはドーパミン産生ニューロンへと分化する細胞のみを含むものではない。

- 未分化な細胞集団からドーパミン産生ニューロンを選択的に濃縮・分離する方法としては、ドーパミン産生ニューロンで発現するチロシンハイドロキシラーゼ
- 20 (TH) 等の遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を細胞集団の各細胞に導入し、蛍光を発する細胞を分離することにより、ドーパミン産生ニューロンを生きたまま可視化して濃縮・分離、または同定する方法(特開 2002-51775 号公報)が提案されている。この方法は、外来
- 25 遺伝子の導入という煩雑な工程を不可欠とするものであり、さらに、遺伝子治療に用いることを目的とする場合、レポーター遺伝子の存在は毒性、免疫原性の面

からも問題である。

発明の開示

- 現時点での PD 移植治療における大きな問題の一つは、中絶胎児の中脳腹側領域あるいは in vitro で分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、いずれも多種の細胞の混合物である点である。神経回路形成における安全性を考えると、目的の細胞種のみを分離してから用いるのが望ましい。また、腫瘍形成の危険性を考慮すれば、分裂停止後の神経細胞を分離してから使用することが良いと考えられる。さらに、細胞の移植先の脳内での生存や、正しくネットワーク形成する能力を考えると、より早期の前駆細胞を分離することにより治療効果を増大させ得ると期待される。そこで、本発明者は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子の単離を試みた。そして既に、分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現する遺伝子の一つとして、新規遺伝子 65B13 の単離に成功し、特許出願した（特願 2002-307573 号）。
- 15 ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5 マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに 2 つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法 (N-RDA; representational difference analysis 法; RDA 法 (Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11:303-7) を改良 (「DNA 断片の量の均一化方法及びサブストラクション法」特願 2001-184757 (出願日 2001/6/19)) により同定した。単離した断片の一つは Lrp4/Corin をコードする cDNA 断片であった。Lrp4 は II 型膜貫通蛋白質をコードしている (図 1)。
- 20

- in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、Lrp4 は中脳ではドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的に発現すると考えられた (図 4 及び
- 25 5)。Lrp4 は胎生期から成人期にかけての心臓に発現しており、血圧調整ホルモンである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の切断を行うと考えられている II

型膜貫通プロテアーゼである。ANP は前駆型である pro-ANP の状態で発現し、細胞外に分泌された後に Lrp4 より細胞膜表面上で切断され、活性型 ANP となると考えられている。これまで、増殖中のドーパミン産生ニューロン前駆細胞で特異的に発現する膜蛋白質をコードする遺伝子は報告されていない。細胞膜表面に発

5 現する Lrp4 蛋白質に対する抗体は、Lrp4 発現細胞の分離に非常に効果的であると考えられる。例えば、抗 Lrp4 抗体を用いて、中脳腹側領域または *in vitro* で分化誘導したドーパミン産生ニューロンを含む培養細胞から、Lrp4 発現細胞を分離することで、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることができる(図 6)。

10 さらに、該前駆細胞をそのまま、または *in vitro* で増殖させた後に移植することも可能である。本発明の前駆細胞は脳内の最適な場所で分化成熟していく可能性や *in vivo* でさらに前駆細胞が増殖する可能性もあり、長期的な治療効果が期待できる。また、Lrp4 発現細胞を *in vitro* で分化、成熟させた後に移植を行えば、*in vivo* で何らかの理由でドーパミン産生ニューロンへの分化が行われな

15 い場合にも、治療効果が期待できる。腫瘍化等の危険性を考慮すれば、*in vitro* で増殖させた Lrp4 発現細胞を分化誘導した後に、65B13 等の分裂停止後のニューロンマーカーを用いて分離した細胞を移植すればより高い安全性が期待できる。いずれの方法でも Lrp4 発現細胞を分離して移植治療に用いることで、目的の細胞種のみを分離しているので安全性が高く、また、最も初期の前駆細胞を用いる

20 ことができるため、生存率やネットワーク形成能等の面でも高い治療効果が期待される。分離直後の初期の前駆細胞で最高の治療効果を得られない場合があったとしても、本発明のマーカーにより分離される前駆細胞は *in vitro* で培養する等して成熟させることもできるため、最適な分化段階の材料を調製することを可能にする(図 6)。

25 一方、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることは、ドーパミン産生ニューロンに特異的な遺伝子の単離等、パーキンソン病治療のターゲット探索

にも有効である。特に増殖前駆細胞を得られるということは、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の研究や、成熟を指標にしたスクリーニング系だけでなく、前駆細胞を *in vitro* または *in vivo* で増殖させる薬剤のスクリーニングや、*in vivo* で前駆細胞から分化を誘導する薬剤(*in vivo* での再生治療薬剤)のスクリーニング等にも有用である。

より具体的には、本発明は

[1] 以下の(1)～(5)の塩基配列から選択される配列を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ、

(1) 配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な塩基配列

10 (2) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列

(3) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列

15 (4) 配列番号:1 または 2 の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列

(5) 上記(1)～(4)の配列中の少なくとも連続した 15 塩基を含む塩基配列

[2] 以下の(1)～(6)から選択されるポリペプチドに対する抗体、

(1) 配列番号:1 または 2 の塩基配列によりコードされるポリペプチド

(2) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

20 (3) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド

(4) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

25 (5) 配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも 8 アミノ酸残基を

有するポリペプチド

[3] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、上記[1]記載のポリヌクレオチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、

5 [4] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、上記[2]記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、

[5] 以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法、

(1) 上記[3]または[4]記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方

10 法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程

(2) 上記(1)において選択された前駆細胞を培養する工程

(3) 上記(2)において培養された前駆細胞を、分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングする工程

[6] 上記[3]～[5]記載の方法により選択された分裂停止前のドーパミン産生ニ

15 ューロン増殖前駆細胞、

[7] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、上記[6]記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む

20 方法、並びに

[8] 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、上記[6]記載の前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法、
に関する。

25

<マーカーポリヌクレオチドプローブ>

本発明のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブは、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択及び/または検出するマーカーとして使用されるものである。該プローブとして使用されるポリヌクレオチドは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現する Lrp4 ポリペ

5 プチドをコードする配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な塩基配列を含むものである。配列番号:1 はマウス Lrp4 cDNA の塩基配列、そして配列番号:2 はヒト Lrp4 cDNA の塩基配列であり、それぞれ GenBank に登録された配列である (マウス: Accession No. NM_016869; ヒト: Accession No. XM_035037)。

ここで、「マーカーポリヌクレオチドプローブ」とは、Lrp4 の発現、特に転

10 写された mRNA を検出することができればよく、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指す。二本鎖 cDNA も組織 in situ ハイブリダイゼーションでプローブとして利用可能であることが知られており、本発明のマーカーにはそのような二本鎖 cDNA も含まれる。組織中の RNA の検出において特に好ましいプローブとなるマーカーポリヌクレオチドプ

15 ロープとしては、RNA プローブ(リボプローブ)を挙げることができる。また、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、β-

20 D-ガラクトシルキューエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシア

25 ミノメチル-2-チオウリジン、β-D-マンノシルキューエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキ

- シウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9-β-D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5 オキシ酢酸、ワイプトキソシン、プソ
- 5 イドウリジン、キューオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイプトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含んでもよい。
- 10 さらに、本発明のマーカポリヌクレオチドプローブは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する Lrp4 ポリペプチドをコードする配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を含む。配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、配列番号:1 または 2 に記載された塩基配列に加えて、遺伝子暗号の縮重に
- 15 より配列番号:1 または 2 記載の配列とは異なる塩基配列を含むものである。本発明のマーカポリヌクレオチドプローブはまた、配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において、膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に対して相補的な配列を含むものを包含する。配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列中、シグナル配列は存在せず、マウス Lrp4(配列番号:3)では 113-135 アミノ酸残基、
- 20 ヒト Lrp4(配列番号:4)では 46-68 アミノ酸残基の部分が膜貫通領域を形成している。なお、配列番号:3 及び 4 に記載の配列も各々GenBank に登録されている。
- ここで、或る「塩基配列に対して相補的」とは、塩基配列が鋳型に対して完全に対になっている場合のみならず、そのうちの少なくとも 70%、好ましくは 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95%以上(例えば、97%または 9
- 25 9%)が対になっているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中の A に対し T(RNA の場合は U)、T または U に対し A、C に対

- 10 -

しG、そしてGに対しCが対応して鎖が形成されていることを意味する。そして
或るポリヌクレオチド同士の塩基配列レベルでの相同性は、BLAST アルゴリズム
(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することが
5 できる。このアルゴリズムに基づいた塩基配列についてのプログラムとして、BLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)が開発されており、
マーカーポリヌクレオチドプローブ配列の相同性の決定に使用することができる。
具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 等を参照
することができる。

- 10 さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブには、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する Lrp4 ポリペプチドをコードする配列番号:1 または 2 の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。Lrp4 については配列番号:1 または 2 で示される塩基配列を有するもの
15 のが公知であるが、そのアルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が存在する可能性があり、そのようなアイソフォームやアレリック変異体に相補的な配列を有するものも本発明のマーカーポリペプチドとして利用することができる。このようなアイソフォーム及びアレリック変異体は、配列番号:1 または 2 の塩基配列を含むポリヌクレオチドをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物の cDNA ライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNA ライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press
20 (1989))を参照することができる。また、市販の cDNA ライブラリー及びゲノムライブラリーを利用してもよい。

より具体的に、cDNA ライブラリーの作製においては、まず、Lrp4 を発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC 法(Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9)等の公知の手法により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を用いて mRNA を精製する。QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)のような、直接 mRNA を調製するためのキットを利用してもよい。次に得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)のような cDNA 合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNA は PCR を利用した 5' -RACE 法(Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32)により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高い cDNA ライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られた cDNA は、適当なベクター中に組み込む。

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer (Amersham Life Science)を用いた方法として、68℃で 30 分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して 1 時間以上 68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1%SDS 中、室温で 20 分の洗浄を 3 回、1×SSC、0.1%SDS 中、37℃で 20 分の洗浄を 3 回、最後に、1×SSC、0.1%SDS 中、50℃で 20 分の洗浄を 2 回行うことも考えられる。その他、例えば Expresshyb Hybridization Solution (CLONTECH) 中、55℃で 30 分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブ

- 12 -

を添加し、37～55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1%SDS 中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS 中、37℃で20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、Lrp4のアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection 9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特にSection2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号:1または2の塩基を含む塩基配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90%(例えば、95%以上、さらには99%)の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、上述の相同性の決定と同様にBLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。上述の塩基配列についてのプログラムBLASTNの他に、このアルゴリズムに基づいたアミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしてBLASTX(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、利用可能である。具体的な解析方法については先に挙げたように、ht

[tp://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).等を参照することができる。

その他、遺伝子増幅技術(PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、Lrp4のアイソフォームやアレリック変異体等、Lrp4と類似した構造及び機能を有する遺伝子を、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから、配列番号:1または2に記載の塩基配列を基に設計したプライマーを利用して得ることができる。

ポリヌクレオチドの塩基配列は、慣用の方法により配列決定して確認することができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等による確認が可能である。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブには、上記(1) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な配列、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域部分を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な配列、及び(4)配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列の各塩基配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドが含まれる。

このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4 mRNAの発現を検出するためのプローブ、増幅して検出を行うためのプライマーとして利用することができる。通常、プローブとして使用する場合には15~100、好ましくは15~35個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15、好ましくは30個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3'末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5'末端側には制限酵素認識配列、

タグ等を付加した形態に設計することができる。このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4 ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。

- 本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、Lrp4 を発現する細胞より上
- 5 述のハイブリダイゼーション法、PCR 法等により調製することができる。また、Lrp4 の公知の配列情報に基づいて、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは化学合成により製造することもできる。特に組織中の RNA の検出に好ましいとされるリボプローブは、例えば、プラスミドベクターpSP64 にクローニングした Lrp4 遺伝子またはその一部を逆方向に挿入し、挿入した配列部分をランオフ
- 10 転写することにより得ることができる。pSP64 は SP6 プロモーターを含むものであるが、その他、ファージ T3、T7 プロモーター及び RNA ポリメラーゼを組合せてリボプローブを作成する方法も公知である。

<抗体>

- 15 本発明により、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を脳組織、または培養細胞より選択するために利用することができる抗体が提供される。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFV) (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp.269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv 等の
- 20 抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じ、PEG 等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、β-ガラクトシダーゼ、マルトース

結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造することにより二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変してもよい。

- 5 本発明の抗体は、(1)配列番号:1または2の塩基配列によりコードされるポリペプチド、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド、(4)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- 10 (5)配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド、並びに(6)前記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチドのいずれかに対して特異的な抗体である。
- 15 本発明の抗体は、Lrp4ポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として利用することにより製造することができる。また、Lrp4ポリペプチドの短い断片はウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合した形で免疫原として用いてもよい。また、Lrp4のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の
- 20 公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてもよい。

本発明における「Lrp4ポリペプチド」はペプチド重合体であり、配列番号:3または4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を好ましい例として挙げることができる。Lrp4ポリペプチドを構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、

- 25 また修飾されたものであっても良い。さらに、Lrp4ポリペプチドには膜貫通領域部分を欠く蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融合蛋白質が

含まれる。

- 本発明において、Lrp4 ポリペプチドは、Lrp4 ポリペプチドの抗原性を有すればよく、配列番号:3 または 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを
- 5 包含する。1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U
- SA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982)
- 10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。そして、このような配列番号:3 または 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有する Lrp4 の抗原性を維持したポリペプチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを公知の『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『C
- 15 urrent Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6 等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製し、適宜発現させること
- 20 により得ることができる。

- Lrp4 ポリペプチド断片は、上記 Lrp4 ポリペプチドの一部と同一であり、少なくとも 8 アミノ酸残基以上 (例えば、8、10、12、または 15 アミノ酸残基以上) からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げることができる。
- 25 α ヘリックス及び α ヘリックス形成領域、 α 両親媒性領域、 β シート及び β シート形成領域、 β 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及び

コイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片が Lrp4 のポリペプチド断片に含まれる。本発明における Lrp4 のポリペプチド断片は、Lrp4 ポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性を解析する方法 (Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法 (Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 251-76) により推定し、さらにコンピュータープログラム (Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認する PEPSCAN 法 (特表昭 60-500684 号公報) 等により確認することができる。

- 10 Lrp4 ポリペプチド、及びポリペプチド断片は、Lrp4 を発現する細胞・組織等を原料として、その物理的性質等に基づいて単離することができる。また、公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することもできる。例えば、Lrp4 ポリペプチドを *in vitro* で製造する場合、*in vitro* トランスレーション (Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44) 等の方法
- 15 に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込み、適当な宿主細胞を選択し該ベクターによる形質転換を行い、形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。
- 20 適当なベクターとして、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターを挙げることができる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。ベクターは、導入された宿主細胞内で所望のポリヌクレオチドが発
- 25 現されるように制御配列を有し、ポリヌクレオチドは該制御配列下に結合される。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソー

ム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリ A シグナル、スプライシング及びポリアデニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現

5 に必要とされるすべての構成成分を含むものである。ベクターは、選択可能なマーカーを含んでいてもよい。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。このようなシグナルペプチドとして、異種蛋白質由来のシグナルペプチドを利用することができる。さらに、必要

10 に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAG または TGA)の挿入を行ってもよい。

in vitro におけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST (Promega)を例示することができる。また、原核細胞宿主における発現に適した

15 種々のベクターが公知であり（『微生物学基礎講座 8 遺伝子工学』（共立出版）等参照）、原核細胞を宿主として選択した場合、当業者であれば選択した宿主に適したベクター、ベクターの宿主への導入方法を適宜選ぶことができる。その他、酵母等の真菌類、高等植物、昆虫、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類、種々の培養系細胞(COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞)、

20 ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT5637(特開昭 63-299 号公報)等)も Lrp4 ポリペプチド及びその抗原性断片を発現させる宿主として利用することができ、各細胞に適したベクター系、ベクターの宿主細胞への導入手法も公知である。さらに、動物の生体内 (Susumu (1985) Nature 315: 592-4; Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54 等参照)、及び植物体において外来蛋白質

25 を発現させる方法も公知であり Lrp4 ポリヌクレオチドを発現させるために利用することができる。

- ベクターへの DNA の挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行うことができる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。また必要に応じ、
- 5 使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高い塩基配列を選択し、Lrp4 ポリペプチドコード発現ベクターを設計することができる (Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: r43-74)。Lrp4 ポリペプチドを産生する宿主は、Lrp4 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものであるが、該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になればよ
- 10 く、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

- 宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DMEM (Virology 8: 396 (1959)、MEM (Science 122: 501 (1952))、RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967))、199 (Proc. Soc.
- 15 Biol. Med. 73: 1 (1950))、IMDM 等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清 (FCS) 等の血清を添加し、pH 約 6~8、30~40℃において 15~200 時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

- 通常、遺伝子組換え技術により製造された Lrp4 ポリペプチドは、まず、ポリ
- 20 ペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物の回収を行う。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈澱、溶媒抽出、硫酸またはエタノール沈澱等を適宜組合せることにより所
- 25 望のポリペプチドを精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、

ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことが

5 できる。また、例えば、GST との融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。Lrp4 ポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa 等を使用して不要な部分を切断することもできる。

10 また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、Lrp4 ポリペプチドに対する抗体を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。さらに、精製したポリペプチドを必要に応じてキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシ

15 ルエンドペプチダーゼ等の酵素を用いて修飾することも可能である。一方、Lrp4 のポリペプチド断片は、上述の Lrp4 ポリペプチドと同じような合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、ペプチダーゼのような適当な酵素を用いて Lrp4 ポリペプチドを切断して製造することもできる。

ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択するためのポリクローナル抗体

20 は、例えば、上述のようにして精製された Lrp4 のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等

25 の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原を Phosphate-Buffered Saline (PBS) または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバン

- 21 -

トを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4〜21日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

また、モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milsteinの方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞を挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液(HAT 培養液)で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。

ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球をin vitroで免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、

- 22 -

ヒト抗体を得ることができる(W092/03918; W093-02227; W094/02602; W094/25585; W096/33735; W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

- 5 また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK 参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養すること
- 10 により抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods
- 15 Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

- 抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al., (1994)
- 20 J. Immunol. 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) Methods Enzymol. 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol. 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 63-9; Bird and Walker (1991) Trends Biotechnol. 9: 132-7 参照)。

- 多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多
- 25 特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32)、(2)

- 異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを融合する方法 (Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髓腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法 (Zimmermann (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる (Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; W093/11161 参照)。
- 10 抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテイン A 及び G を用いて行う他、抗体以外のポリペプチドの製造の場合と同様に上記した蛋白質精製技術によっても行い得る (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテイン A を利用する場合、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia)等のプロテイン A カラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) 等により決定することができる。
- 15

- 抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、ELISA 等により測定することができる。ELISA 法により測定する場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いで Lrp4 ポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次
- 20
- 25 抗体がアルカリホスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定する

ことができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore (Pharmacia) 等の市販の系を使用することもできる。

<ドーパミン産生ニューロンの選択方法>

- 5 本発明により分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択的に均一な集団として選択する方法が提供された。分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、本発明のマーカールポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いて選択することができる。ここで、「選択」という用語は、或る試料中におけるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞の存在を検出すること、及び、存在を
- 10 検出しさらに分離または単離することの両方を含むものである。より具体的には、本発明は、本発明のマーカールポリヌクレオチドプローブとドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法を提供するものである。該方法においては、マーカールポリヌクレオチドプローブを好ましくは放射性同位体または非
- 15 放射性化合物で標識しておく。例えば、標識するための放射性同位体としては、 ^{35}S 、 ^3H 等を挙げることができる。放射標識したマーカールポリヌクレオチドプローブを用いた場合、エマルジョンオートラジオグラフィーにより銀粒子を検出することによりマーカールと結合する RNA を検出することができる。また、マーカールポリヌクレオチドプローブ標識のための非放射性同位体としては、ビオチン、ジ
- 20 ゴキシゲニン等が例示される。ビオチン標識マーカールの検出は、例えば、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識したアビジンを用いて行うことができる。一方、ジゴキシゲニン標識マーカールの検出には、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識した抗ジゴキシゲニン抗体を使用することが
- 25 できる。酵素標識を使用する場合には、酵素の基質と共にインキュベートし、安定な色素をマーカール位置に沈着させることで検出を行う。特に蛍光を利用した、

in situ ハイブリッド形成法 (FISH) が簡便であり、特に好ましいものである。

- また、本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択するための抗体とドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロンの選択方法が提供される。即ち、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むことが予測される細胞試料と本発明の抗体とを接触させ、抗体に結合する細胞を選択することで Lrp 4 ポリペプチドを発現している細胞、即ち、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を取得できる (図 6 参照)。細胞との接触前に、抗体を適当な担体に固定化して用いることも可能である。または、細胞と抗体とを接触させ、結合させた後、抗体のアフィニティーによる精製を行うことで、該抗体と結合した細胞を選択的に回収することもできる。例えば、本発明の抗体がビオチンと結合されている場合には、アビジンやストレプトアビジンを結合したプレートやカラムに対して添加することにより精製を行うことができる。その他、例えば、磁性粒子を抗体に結合し、該抗体及び抗体に結合した Lrp4 を細胞表面上に発現している細胞を磁石を利用して回収することもできる。また、セルソーター、及び蛍光等により標識した抗 Lrp4 抗体を使用して、フローサイトメトリーにより Lrp4 を発現するドーパミン産生ニューロンを選択することもできる。

- さらに、本発明により、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を培養し、培養した前駆細胞を分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングすることにより、腫瘍化する危険性の低い移植治療に特に適したドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることができる。分裂停止後のニューロンマーカーとしては、例えば 65B13 を挙げることができる。例えば、65BB13 ポリペプチドに対する抗体を培養したドーパミン産生ニューロン前駆細胞と接触させて 65B13 ポリペプチドを発現している細胞を選択することにより分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することができる。また、65B13 は Ig ドメイン接着分子

様の構造を有する。培養細胞中で 65B13 発現させた場合、65B13 を発現させた細胞同士は接着するのに対し、65B13 を発現させていない細胞とは接着しない。そのため、65B13 を介した接着はホモフィリックな結合と考えられている。そこで、65B13 ポリペプチドの細胞外領域部分の接着を利用した 65B13 発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞のスクリーニングも可能である。

Lrp4 発現ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞及び 65B13 発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択及び/またはスクリーニングは、各々 Lrp4 または 65B13 に対するプロモーターを利用して行うこともできる(例えば、特開 2002-51775 号公報参照)。例えば、後述する Lrp4 の発現領域解析により得られるプロモーター部分に対し、GFP 等の検出可能なマーカーをコードする遺伝子を連結した構築物を含むベクターを細胞に対してトランスフェクションすることができる。その他、Lrp4 遺伝子座へマーカーをコードする遺伝子をノックインすることができる。どちらの場合にも、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的にマーカー遺伝子の発現が検出されることとなり、特異的な細胞の選択が可能となる。65B13 についても Lrp4 と同様の方法によりスクリーニングが可能である。65B13 については、例えば、特願 2002-307573 号明細書に記載の配列を参照することができる。

ここで使用する細胞試料は好ましくは、中脳腹側領域の細胞、または *in vitro* で分化誘導されたドーパミン産生ニューロンを含む培養培地である。*in vitro* におけるドーパミン産生ニューロンの分化誘導は、公知の ES 細胞、骨髄間質細胞、神経由来の不老化セルライン(特表平 8-509215 号公報；特表平 11-506930 号公報；特表 2002-522070 号公報)、ニューロン始原細胞(特表平 11-509729 号公報)等の細胞を出発材料として、公知の方法により行うことができる。通常、ドーパミン産生ニューロンは、脳のドーパミン産生ニューロン領域から得た組織を神経組織由来の支持細胞層と共培養することにより分化させることができる。さらに、線条体及び皮質等の通常非ドーパミン産生神経組織からドーパミン産生細

胞を誘導する方法も知られている(特表平 10-509319 号公報)。また、低酸素条件下での培養により、より多くドーパミン産生ニューロンを含む細胞が得られるとの報告もある(特表 2002-530068 号公報)。本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択に用いる細胞試料は、これらを含む如何なる方法により分離または

5 培養された細胞群であってもよい。

また、本発明の抗体またはポリペプチドを固定する担体としては、細胞に対して無害なものである必要がある。例えば、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、及びこれらの表面に多糖類、合成高分子等をコーティングしたものが考えられる。担体の形状には

10 特に制限はなく、膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられ、その厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、大きさを種々変えることにより接触面積を制御することができる。

<ドーパミン産生ニューロン前駆細胞>

15 このようにして Lrp4 の発現を指標として獲得された細胞は、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞であることから、従来の雑多な細胞集団または外来遺伝子を導入したドーパミン産生ニューロンと比べて、安全性、生存率、ネットワーク形成能の面で PD 等の神経変性疾患の移植治療に好ましいものである。Lrp4 の発現を指標として獲得された細胞は、そのまま、または in vitro で

20 増殖させた後に移植に使用することができる(図 6)。本発明の Lrp4 の発現を指標として選択されるドーパミン産生ニューロン前駆細胞は増殖中の前駆細胞であることから、脳内の最適な場所で分化成熟していく可能性、また in vivo においてさらに前駆細胞が増殖する可能性があることから、より長期的な治療効果が期待される。さらに、本方法により得られた本発明の細胞(群)は、分裂停止前の前

25 駆細胞であることから、in vitro において培地等の条件を選択することにより適当な段階まで分化させることも可能であり、種々の神経移植治療の材料として

も好ましいものである。例えば、前述したように、Lrp4 の発現を指標として選択された細胞について、さらに細胞分裂停止直後のマーカー(例えば、65B13)を指標とした選択を行うことにより、より移植の上では安全性の高い細胞を得ることもできる。

- 5 本発明の方法により得られたニューロン前駆細胞の移植では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個、さらに好ましくは $5 \sim 6 \times 10^4$ 個のニューロンを移植する。第 1 の方法としては、細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定術(stereotaxic surgery)が挙げられる。また、ミクロ手術(microsurgery)により細胞を移植しても良い。ニューロン組織の移植方法については、Backlund 等(Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73)、Lindvall 等(Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68)、Madrazo 等(Madrazo et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4)の方法を参照することができる。

- さらに、本発明の細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD 治療のターゲット探索、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、
15 並びに成熟を指標としたスクリーニング等にも利用することができる。

<遺伝子発現レベルの比較>

- 本発明の抗体を用いて得られた分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、該細胞において特異的に発現している遺伝子を単離する材料として使用
20 することができる。さらに、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的に発現している遺伝子を調べ、単離することもできる。また、分化／誘導／増殖させた細胞と元の前駆細胞とにおいて発現レベルに差違のある遺伝子を調べることによりドーパミン産生ニューロンの生体内における分化に必要とされる遺伝子を調べることもできる。このような遺伝子
25 はドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治

療対象候補となり得るので、当該遺伝子を決定し、単離することは非常に有用である。

本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞と該細胞から分化／誘導／増殖された細胞若しくはその他の細胞、または該分化／誘導／増殖された細胞とその他の細胞との間での遺伝子の発現レベルの比較は、慣用の細胞 in situ ハイブリダイゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、RNA ドットブロットハイブリダイゼーション、逆転写 PCR、RNase 保護アッセイ、DNA マイクロアレイハイブリダイゼーション、遺伝子発現の連続解析 (SAGE; serial analysis of gene expression) (Velculescu et al. (1995) Science 270: 484-7)、差し引きハイブリダイゼーション (subtractive hybridization)、代表差違分析 (representation difference analysis; RDA) (Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7) 等により行うことができる。

細胞 in situ ハイブリダイゼーションでは、特定の RNA 配列に特異的な標識プローブを用い細胞から調製した総 RNA または polyA⁺RNA に対してハイブリダイゼーションを行うことにより、個々の細胞における RNA のプロセッシング、輸送、細胞質への局在化が起こる場所等を調べることができる。また、RNA の大きさをゲル電気泳動等によりサイズ分画して決定することもできる。また、定量的な蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 及びデジタル画像顕微鏡を用いれば、RNA 転写産物を in situ で視覚的に捉えることも可能であり (Femino et al. (1998) Science 280: 585-90)、本発明において利用することができる。

遺伝子発現の解析で逆転写 PCR を用いた場合、特定遺伝子の発現を大まかに定量することができる。本方法では、1 つの RNA 転写産物の種々のアイソフォームを検出及び解析することも可能である。逆転写 PCR においてはまず、エキソン特異性プライマーを用いた逆転写 PCR を行い、予想された産物以外の増幅産物が検出された場合、それらを解析することにより選択的スプライシングにより生じる mRNA アイソフォームを同定することが可能である。例えば、Pykett et al. (19

94) Hum. Mol. Genet. 3: 559-64 等に記載の方法を参照することができる。特に大まかな発現パターンを迅速に解析することが求められる場合、本発明の PCR を利用した本方法は、その速さ、感度の高さ、簡便さの点からも望ましいものである。

- 5 DNA チップを使用することにより、遺伝子発現スクリーニングの能率を向上させることができる。ここで、DNA チップとは、ガラス等の担体表面上にオリゴヌクレオチドまたは DNA クローン等を高密度に固定した小型のアレイである。例えば、多重発現スクリーニングを行うためには、各目的遺伝子に対する cDNA クローンまたは該遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドをチップに対して固定化し、
- 10 マイクロアレイを作製する。次に本発明のドーパミン特異的ニューロン前駆細胞、または該細胞より分化／誘導／増殖された細胞より RNA を調製し、逆転写酵素処理を行い、cDNA を得る。次に、得られた cDNA 試料を蛍光タグ等のタグにより標識し、マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを行う。その結果、総標識 cDNA 中、細胞内で活発に発現している遺伝子の割合が高くなり、あまり発現
- 15 されていない遺伝子の割合は低くなる。即ち、標識 cDNA とチップ上の cDNA クローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を表す蛍光シグナルの強度は、標識 cDNA 内での各配列の発現の度合いを示すこととなり、遺伝子発現の定量を可能成らしめる。

- また、縮重 PCR プライマーを用いた逆転写 PCR を行う mRNA ディファレンシャルディスプレイにより、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該
- 20 細胞から分化／誘導／増殖された細胞について多数の遺伝子の発現を同時に解析することもできる。まず、特定の mRNA の polyA 尾部に 3' 末端の 1 または 2 つの塩基を変更した修飾オリゴ dT プライマーを準備し、本発明の前駆細胞または該細胞から分化／増殖された細胞、及び、発現を比較する対照細胞から単離した
- 25 総 RNA に対して逆転写酵素反応を行う (Liang et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 3269-75)。変更した塩基が「G」であれば、polyA 尾部の直前に C を持つ mR

NA を選択的に増幅することができ、また「CA」であれば、TG を直前に持つ mRNA を増幅することができる。次に、第 2 のプライマーとして、10 塩基程度の長さの任意の配列を有するものを用意し、修飾オリゴ dT プライマー及び第 2 のプライマーを使用して PCR 増幅反応を行う。増幅産物を泳動距離の長いポリアクリル

5 アミドゲルを用いて電気泳動し、サイズ分画する。このような方法により、本発明の細胞と対照細胞とで各細胞に特異的に発現している mRNA 由来の cDNA は、一方の試料を泳動した場合にのみ検出されるバンドとして検出することができる。この方法では、同定されていない遺伝子の発現についても解析することができる。

SAGE 分析は、多数の転写産物の発現を同時に検出することができ、また検出

10 に特殊な装置を必要としない点で好ましい分析方法の一つである。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞より polyA⁺RNA を慣用の方法により抽出する。次に、ビオチン化オリゴ dT プライマーを用い、前記 RNA を cDNA に変換し、4 塩基認識制限酵素(アンカー用酵素;AE)で処理する。これにより、AE 処理断片はその 3' 末端にビオチン基を含

15 んだ形となる。次に、AE 処理断片をストレプトアビジンに結合させる、結合された cDNA を 2 画分に分け、それぞれの画分を別々の 2 本鎖オリゴヌクレオチドアダプター(リンカー)A 及び B に連結する。このリンカーは、(1)アンカー用酵素の作用で生じる突出部の配列と相補的な配列を有する 1 本鎖突出部、(2)タグ用酵素(tagging enzyme;TE)となる IIS 型制限酵素(認識部位より 20bp 以下の離

20 れた定位置の切断を行う)の 5' 塩基認識配列、及び(3)PCR 用特異的プライマーを構成するのに十分な追加配列より構成される。ここで、リンカーを連結した cDNA をタグ用酵素で切断することにより、リンカー結合型の状態で cDNA 配列部分のみが短鎖配列タグとなる。次に、リンカーの異なる 2 種類のプールを互いに連結し、リンカー A 及び B に特異的プライマーを使用して PCR 増幅する。その結

25 果、増幅産物はリンカー A 及び B に結合した 2 つの隣接配列タグ(ダイタグ;ditag)を含む多様な配列の混在物として得られる。そこで、増幅産物をアンカー用酵

素により処理し、遊離したダイタグ部分を通常の連結反応により鎖状に連結し、クローニングを行う。クローニングにより得られたクローンの塩基配列を決定することにより、一定長の連続ダイタグの読み出しを得ることができる。このようにしてクローンの塩基配列を決定し、配列タグの情報が得られれば、それぞれの

5 タグに該当する mRNA の存在を同定することができる。

差し引きハイブリダイゼーションは、種々の組織または細胞間で発現の差のある遺伝子のクローニングによく用いられる方法であるが、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、またはそれから分化／誘導／増殖された細胞において特異的に発現している遺伝子をクローニングするのにも使用することができる。

- 10 まず、本発明の前記細胞のうちの試験する細胞の DNA 試料を調製する(以下、テスト DNA と呼ぶ)。次に、比較する細胞の DNA(以下、ドライバー DNA と呼ぶ)を調製する。テスト DNA とドライバー DNA とを逆に用いることもできる。いずれにせよ、テスト DNA に存在し、ドライバー DNA に存在しない遺伝子の存在が検出される。次に、調製したテスト DNA 及び大過剰量のドライバー DNA を混合し、変性させ一本鎖 DNA とした後にアニーリングさせる。アニーリング条件を調節すること
- 15 により、ドライバー DNA 中には存在しない特異的な配列をテスト DNA 由来の DNA のみからなる二本鎖 DNA として単離することができる。より詳細な方法については、Swaroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954 及び Yasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9 等を参照することができる。

- 20 RDA 法は、PCR を利用した、ドライバー DNA に存在しないテスト DNA 中の配列を選択的に増幅することを可能とする方法であり、上述のその他の方法と同様に本発明において用いることができる。より詳細な手順については、Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7 及び Schutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5950-4 を参照することができる。

- 25 以上のようにして検出、単離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的な遺伝子を上述の各種公

知の方法によりベクター等に挿入し、配列決定、発現解析を行うこともできる。

<前駆細胞の成熟を指標としたスクリーニング>

- 本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に対し、被験物質
- 5 5 を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。本方法によりスクリーニングされる化合物は、ドーパミン産生ニューロンの分化、増殖等を調節する機能を示すことから、ドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得、有用と考えられる。
- 10 10 ここで、「被験物質」とはどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドデ
- 15 15 ィスプレイライブラリーが挙げられる。

細胞の分化や増殖は、被験物質と接触させない場合における細胞の状態と比較することにより検出することができる。細胞の分化や増殖は、顕微鏡下において形態学的な観察を行うこと、または、細胞で産生されるドーパミン等の物質を検出、定量して検出してもよい。

20

<Lrp4 の発現領域解析>

- Lrp4 の発現制御領域は、Lrp4 の遺伝子配列を利用してゲノム DNA から公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、S1 マッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊 8 新細胞工学実験プロトコール, 東京
- 25 25 大学医科学研究所制癌研究部編, 秀潤社 (1993) pp. 362-374) が公知であり、利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の 5' 末端の 15~100bp、

- 34 -

好ましくは 30～50bp をプローブ DNA として利用して、ゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列番号:1 または 2 の塩基全部またはその 1 部)。このようにして得られるクローンは、10kbp 以上の 5' 非翻訳領域を含むものであるので、次にエキソヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利用して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、Lrp4 の発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

遺伝子の発現制御領域は、Neural Network 等のプログラム(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996))を用いて予測することもできる。さらに、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム(<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>; Prestridge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-32)も公知であり、用いることができる。

このようにして単離された、Lrp4 遺伝子の発現領域は、in vivo で分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的に所望の蛋白質を産生するのに利用することもできる。

20 <Lrp4 に対するリガンド>

Lrp4 ポリペプチドは膜貫通ドメインを有することから、天然において細胞膜中に埋め込まれた状態で存在すると考えられる。Lrp4 は、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞で発現されていることから、前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられる。従って、Lrp4 に対するアゴニストやアンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、ドーパミン産生ニューロンの in vivo、ex vivo 及び in vitro における分化を制

御するのに利用できる可能性がある。Lrp4 ポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、Lrp4 ポリペプチドと候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、Lrp4 ポリペプチドを担体に固定したり、細胞膜に埋めこまれた状態に発現させて用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並びにファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群(J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991))等が含まれる。また、結合の検出を容易にするために、候補化合物は標識しても良い。

10

<Lrp4 の発現抑制>

本発明により、Lrp4 が分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞で一過性に発現されることが明らかにされたことから、Lrp4 が前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられた。従って、Lrp4 遺伝子の発現を阻害するものは、ドーパミン産生ニューロンの *in vivo*、*ex vivo* 及び *in vitro* における分化を制御するのに利用できる可能性がある。遺伝子の発現を阻害し得るものとして、例えば、アンチセンス、リボザイム及び2本鎖RNA(small interfering RNA; siRNA)が挙げられる。従って、本発明はこのようなアンチセンス、リボザイム及び2本鎖RNAを提供するものである。

15

20

25

アンチセンスが標的遺伝子の発現を抑制する機構としては、(1)3重鎖形成による転写開始阻害、(2)RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3)合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4)イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリ

ッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA 翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生物化学実験講座 2 核酸 IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp. 319-347 (1993))。

本発明の Lrp4 アンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードする DNA は、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸は、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp 以上、さらに好ましくは 500bp 以上であり通常 3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内、より好ましくは 1000bp 以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、Lrp4 ポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21)等により調製することができる。

リボザイムとは、RNA を構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスモールリボザイム(small liboyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に 5' -リン酸と 3' -ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる 5' -スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループ I イントロン RNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経

る二段階反応で行うグループ II イントロン RNA、及び(3)加水分解反応による tRNA 前駆体を 5' 側で切断するリボヌクレアーゼ P の RNA 成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp 程度)であり、RNA を切断して、5' -ヒドロキシル基と 2' -3' 環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くの RNA 配列と相補的となるように設計することにより、標的 RNA 中の塩基配列 UC、UU または UA を認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素 35: 2191; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)。

本発明のアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、または naked DNA として ex vivo 法または in vivo 法により遺伝子治療に用いることもできる。

1998 年に、線虫において RNA 同士が邪魔し合い働きを失う現象(RNA 干渉)が観察された(Fire et al. (1998) Nature 391: 806-11)。RNA 干渉とは、二本鎖の人工 RNA を細胞に導入することにより、同じ塩基配列を有する RNA が分解される現象である。その後の研究により、RNA 干渉等の RNA サイレンシングの現象は、欠陥を持つ mRNA の排除、並びにトランスポゾン、ウイルス等の寄生体に対する

防御のための細胞機構であることが示唆されている。現在では、多くの遺伝子の発現を抑制するためのツールとして、二本鎖 RNA (small interfering RNA; siRNA) が利用されており、病気の原因遺伝子等の発現抑制を siRNA を用いて行うことにより病気を治療・予防する方法も検討されている。本発明の siRNA は、

- 5 Lrp4 の mRNA の転写を阻害する限り、特に限定されない。通常、siRNA は、標的 mRNA の配列に対するセンス鎖及びアンチセンス鎖の組合せであり、少なくとも 10 個から標的 mRNA と同じ個数までのヌクレオチド長を有する。好ましくは、15 ～75 個、より好ましくは 18～50 個、さらに好ましくは 20～25 個のヌクレオチド長である。
- 10 Lrp4 発現を抑制するために、siRNA は公知の方法により細胞に導入することができる。例えば、siRNA を構成する二本の RNA 鎖を、一本鎖上にコードする DNA を設計し、該 DNA を発現ベクターに組み込み、細胞を該発現ベクターで形質転換し、siRNA をヘアピン構造を有する二本鎖 RNA として細胞内で発現させることができる。トランスフェクションにより持続的に siRNA を産生するプラスミド発現
- 15 ベクターも設計されている（例えば、RNAi-Ready pSIREN Vector、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (BD Biosciences Clontech)）。

siRNA の塩基配列は、例えば、Ambion website (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) のコンピュータープログラムを用いて設計することができる。機能的 siRNA をスクリーニングするためのキット（例えば、BD Knock

20 out RNAi System (BD Biosciences Clontech)）等も市販されており利用可能である。

図面の簡単な説明

図 1 は、Lrp4 の構造を模式的に示す図である。TM:膜貫通ドメイン、FRI:friz

25 zeled ドメイン、LDLa:LDL レセプタードメイン、SR:スカベンジャーレセプタードメイン、Pro:セリンプロテアーゼドメイン。

図2は、Lrp4 及び Shh の mRNA の E12.5 マウス後脳腹側及び脊髄における発現を in situ ハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

図3は、Lrp4、Shh、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、及び NCAM の mRNA の E12.5 マウス中脳腹側における発現を in situ ハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

図4は、Lrp4 の中脳における発現パターンを模式的に示す図である。VZ: ventricular zone、ML: mantle layer。

図5は、ドーパミン産生ニューロンの発生から成熟までの間における Lrp4、65B13、TH、NCAM 及び DAT の発現時期を模式的に示す図である。

10 図6は、抗 Lrp4 抗体を用いたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞の分離及び活用法を示す模式図である。

図7は、Lrp4 の mRNA の E12.5 マウス中枢神経系における発現を in situ ハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。A:矢状面；B:Aの
15 枠内部分の拡大写真；C:Aの赤線位置での断面。D:Lrp4、Shh 及びチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の mRNA の E12.5 マウス中脳腹側における発現を示す。

図8は、ES細胞からの in vitro ドーパミン産生ニューロン分化系における Lrp4 の発現について示す。上は、ES細胞からのドーパミン産生ニューロンの分化を模式的に示す図である。下の写真は、SDIA法によりES細胞よりドーパミン産生ニューロンを分化誘導し、時間を追って Lrp4 の発現を RT-PCR 法で調べた結果
20 を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、これらの実施例は本発明をいかなる意味でも限定するものではない。

25 1. ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子の単離及び配列解析

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5

マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに二つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション(N-RDA)法により同定した。単離した断片の一つはLrp4/CorinをコードするcDNA断片であった。Lrp4はII型膜貫通蛋白質をコードしている(図1)。

5 (1)N-RDA 法

(1)-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100 μ Mに調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

10 ad2S: cagctccacaacctacatcattccgt (配列番号:5)

ad2A: acggaatgatgt (配列番号:6)

ad3S: gtccatcttctctctgagactctggt (配列番号:7)

ad3A: accagagtctca (配列番号:8)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtgtgt (配列番号:9)

15 ad4A: acacactcacag (配列番号:10)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtagacagt (配列番号:11)

ad5A: actgtcacactg (配列番号:12)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcgt (配列番号:13)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号:14)

20 (1)-2. cDNA 合成

日本SLCより入手したマウス12.5日胚より中脳腹側を切り出し、さらに背腹方向に2つの領域に切り分けた。RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて全RNAを調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて二本鎖cDNAを合成した。制限酵素RsaIで消化したのち、ad2を付加し、ad2Sをプライマーとして、15サイクルの

25 PCRでcDNAを増幅した。増幅条件は72°Cで5分インキュベートした後、94°Cで30秒、65°Cで30秒、及び72°Cで2分の反応を15サイクル行い、最後に72°Cで

- 41 -

2分インキュベートした。N-RDAのPCRはすべて以下の反応液組成で行った。

	10×ExTaq	5 μ l
	2.5mM dNTP	4 μ l
	ExTaq	0.25 μ l
5	100 μ M primer	0.5 μ l
	cDNA	2 μ l
	蒸留水	38.25 μ l

(1)-3. Driverの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は9
10 4℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分
の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PC
R purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。1回の
サブトラクションに3 μ gずつ使用した。

(1)-4. Testerの作製

15 ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃
で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の
反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR
purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。60ngのRs
aI消化cDNAにad3を付加した。

20 (1)-5. サブトラクション1回目

上記3及び4で作製したTesterおよびDriverを混合し、エタノール沈殿した
後に、1xPCR buffer 1 μ lに溶解した。98℃5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1
 μ lを加えた。さらに98℃5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズさせたcDNAをad3Sをプライマーとして10サイクルのPCRで
25 増幅した後(72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及
び72℃で2分の反応を10サイクル行った)、Mung Bean Nuclease (TAKARA)で

- 42 -

消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。さらに 13 サイクルの PCR で増幅した。増幅条件は 94℃で 2 分インキュベートした後、94℃で 30 秒、65℃で 30 秒、及び 72℃で 2 分の反応を 13 サイクル行い、最後に 72℃で 2 分インキュベートした。

5 (1)-6. 均一化

サブトラクション 1 回目で増幅した cDNA 8ng に 2xPCR buffer 1 μ l を加えた。98℃ 5 分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2 μ l を加えた。さらに 98℃ 5 分の後、68℃で 16 時間ハイブリダイズさせた。

10 ハイブリダイズさせた cDNA を RsaI で消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。これを ad3S をプライマーとして 11 サイクルの PCR で増幅した後 (94℃で 2 分インキュベートした後、94℃で 30 秒、65℃で 30 秒、及び 72℃で 2 分の反応を 11 サイクル行い、最後に 72℃で 2 分インキュベートした) RsaI で消化し、ad4 を付加した。

(1)-7. サブトラクション 2 回目

15 上記 6 で ad4 を付加した cDNA 20ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、さらに、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的に RsaI 消化した cDNA に ad5 を付加した。

(1)-8. サブトラクション 3 回目

20 上記 7 で ad5 を付加した cDNA 2ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、さらに、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的に RsaI 消化した cDNA に ad13 を付加した。

(1)-9. サブトラクション 4 回目

25 上記 8 で ad13 を付加した cDNA 2ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、以下、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅した cDNA を pCRII (Invitrogen) にクローニングし、ABI3100 シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。

2. Lrp4 遺伝子の発現解析

次に、Lrp4 遺伝子を用いて以下のプロトコールにより in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

- 5 まず、マウス 12.5 日胚を OCT で包埋し、厚さ 16 μ m の新鮮凍結切片を作製した。スライドガラス上で乾燥させた後に 4%PFA で室温 30 分間固定した。PBS で洗淨した後、ハイブリダイゼーション (1 μ g/ml DIG 化 RNA プロブ、50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS, 50 μ g/ml yeast RNA, 50 μ g/ml Heparin) を 65 度で 40 時間行った。その後、洗淨 (50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS) を 65 度で行い、
- 10 RNase 処理 (5 μ g/ml RNase) を室温 5 分間行った。0.2xSSC で 65 度の洗淨、1xTBS で室温の洗淨ののち、ブロッキング (Blocking reagent: Roche) を行った。アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (DAKO) を反応させ、洗淨 (1xTBS、2mM Levamisole) の後、NBT/BCIP (DAKO) を基質として発色させた。

- in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、ドーパミン産生ニュー
- 15 ーロンの発生する時期である E12.5 で、Lrp4 は中脳から後脳、脊髄にかけての腹側中心部に特異的発現していることが示された。後脳から脊髄にかけては、Shh と同様の発現パターンを示し、オーガナイザー領域である底板(floor plate) に特異的であることが明らかになった(図 2 及び 7)。中脳では Shh 発現領域の中でもより中心部にのみ発現が見られた(図 3 及び 7)。

- 20 ニューロンの成熟マーカーである NCAM と比較した結果、Lrp4 発現細胞は NCAM 陰性の脳室領域(Ventricular Zone (VZ))内の増殖前駆細胞であった。さらにドーパミンニューロンのマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH)の発現と比較すると、TH は外套層(mantle layer(ML))にのみ発現しているので、同一の細胞で両者の発現が認められることはないものの、背-腹軸
- 25 方向での発現領域は完全に一致していた(図 3 及び 7)。一般に神経管(neural tube)内の神経細胞は、まず VZ 内で増殖し、分化開始とともに分裂を停止し、その

後すぐ外側の ML に移動したのちに成熟することが知られている。従って、ドーパミン産生ニューロンの前駆細胞は、TH 発現領域のすぐ内側の VZ 内で増殖し、分裂停止後に外側に移動してから TH を発現すると考えられる。即ち、Lrp4 は中脳ではドーパミン産生ニューロンの前駆細胞に特異的に発現すると考えられる

5 (図 4 及び 5)。

3. ES 細胞より分化誘導したドーパミン産生ニューロンにおける Lrp4 の発現

次に ES 細胞を in vitro でドーパミン産生ニューロンに分化誘導させた場合に Lrp4 が発現するかどうか検討した。

- 10 まず、SDIA 法 (Kawasaki et. al. (2000) Neuron 28(1): 31-40) により ES 細胞よりドーパミンニューロンへの分化誘導を行った (図 8 上参照)。誘導後 4、6、8、10、12 日後にそれぞれ細胞を回収し、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を回収し、RT-PCR を行った。RT-PCR においては、最初に $1\mu\text{g}$ の total RNA に対して、RNA PCR kit (TaKaRa) を用いて cDNA 合成を行った。このう
- 15 ち 10ng、1ng、0.1ng 相当分の cDNA を鋳型に用いて以下の反応系で PCR を行った。

	10×ExTaq	2 μl
	2.5mM dNTP	1.6 μl
	ExTaq	0.1 μl
	100 μM プライマー	各 0.2 μl
20	cDNA	1 μl
	蒸留水	14.9 μl

94℃で 2 分インキュベートした後、94℃で 30 秒、65℃で 30 秒、及び 72℃で 2 分の反応を 35 サイクル行い、最後に 72℃で 2 分インキュベートした。

以下の配列のプライマーを使用した。

- 25 Lrp4: TAGTCTACCACTGCTCGACTGTAACG / CAGAGTGAACCCAGTGGACATATCTG
TH: GTTCCCAAGGAAAGTGTCAGAGTTGG / GAAGCTGGAAAGCCTCCAGGTGTTCC

- 45 -

DAT: CTCCGAGCAGACACCATGACCTTAGC / AGGAGTAGGGCTTGTCTCCCAACCTG

そして、RT-PCR による発現解析の結果、Lrp4 は ES 細胞 (CCE) およびストローマ細胞 (PA6) には発現していないが、分化誘導の結果、TH と同様に 4 日目から発現が誘導されることが明らかになった (図 8)。従って、胎児中脳由来のドーパミンニューロン増殖前駆細胞だけでなく、in vitro で ES 細胞より分化誘導したドーパミンニューロン増殖前駆細胞を分離する際にも Lrp4 はマーカーとして有用である。

10 産業上の利用の可能性

本発明により、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する遺伝子 Lrp4 が同定された。細胞における該 Lrp4 の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成面の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。また、分裂停止前のニューロン増殖前駆細胞を選択的に得られるため、成熟した細胞の求められる治療等において使用する場合であっても、in vitro で最適な状態へと容易に分化させることができる。さらに、本発明の遺伝子を用いて得られるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞により、該細胞に特異的に発現している遺伝子を単離することが可能となった。該細胞は、パーキンソン病等の神経変性疾患に対する医薬を開発する上でも有用と考えられる。分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞という、ニューロン形成における初期の前駆細胞は、さらに、ニューロンの成熟過程、即ち、成熟過程に関与する種々の因子を明らかにするのに役立つ。このような因子の解明は、神経変性疾患の治療に大きく貢献することが予期される。さらに、該細胞の成熟を指標として、その過程を調節(阻害または促進)するような物質のスクリーニングに用いることもできる。

請求の範囲

1. 以下の(1)～(5)の塩基配列から選択される配列を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ。
 - 5 (1) 配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な塩基配列
 - (2) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列
 - (3) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列
 - 10 (4) 配列番号:1 または 2 の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列
 - (5) 上記(1)～(4)の配列中の少なくとも連続した 15 塩基を含む塩基配列
2. 以下の(1)～(6)から選択されるポリペプチドに対する抗体。
 - (1) 配列番号:1 または 2 の塩基配列によりコードされるポリペプチド
 - 15 (2) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (3) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (4) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - 20 (5) 配列番号:1 または 2 の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド
 - (6) 上記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも 8 アミノ酸残基を有するポリペプチド
3. ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、請求項
25 1 記載のポリヌクレオチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

4. ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、請求項 2 記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。
5. 以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法。
 - 5 (1) 請求項 3 または 4 記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程
 - (2) 上記 (1) において選択された前駆細胞を培養する工程
 - (3) 上記 (2) において培養された前駆細胞を、分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングする工程
- 10 6. 請求項 3 乃至 5 記載の方法により選択された分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞。
7. ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項 6 記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖され
- 15 た細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。
8. 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、請求項 6 記載の前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法。

図 1

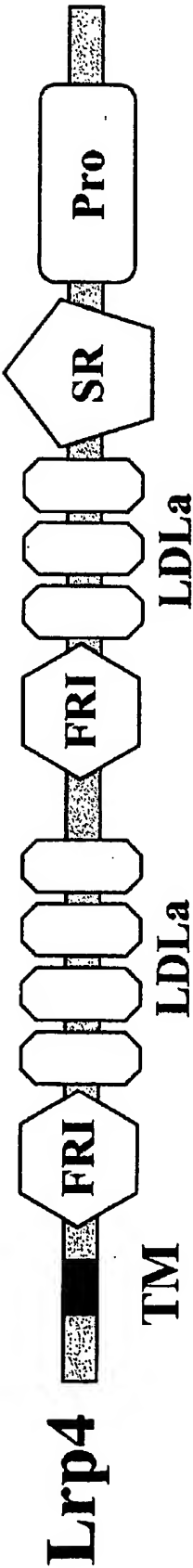


図 2

後脳

Lrp4

Shh

脊髄

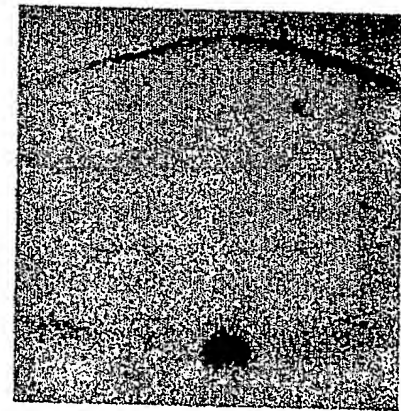
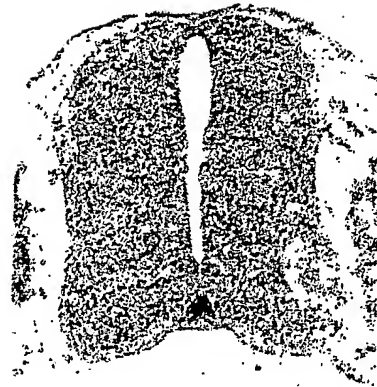
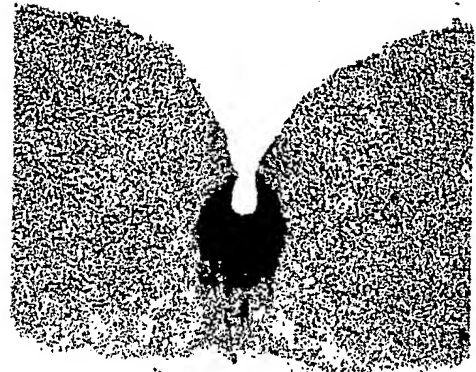
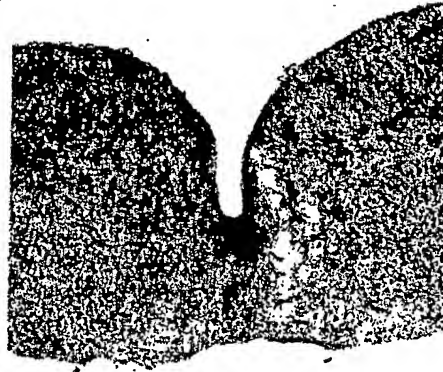


図 3

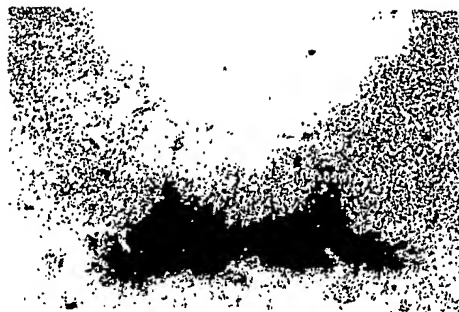
Lrp4**TH****Shh****NCAM**

図 4

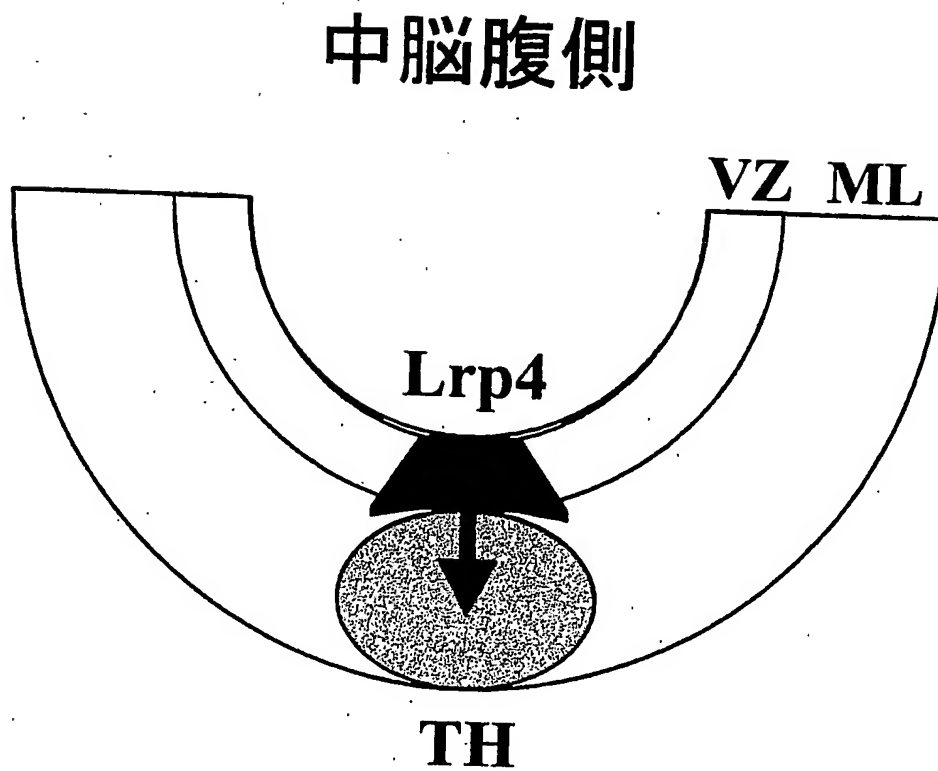


図 5

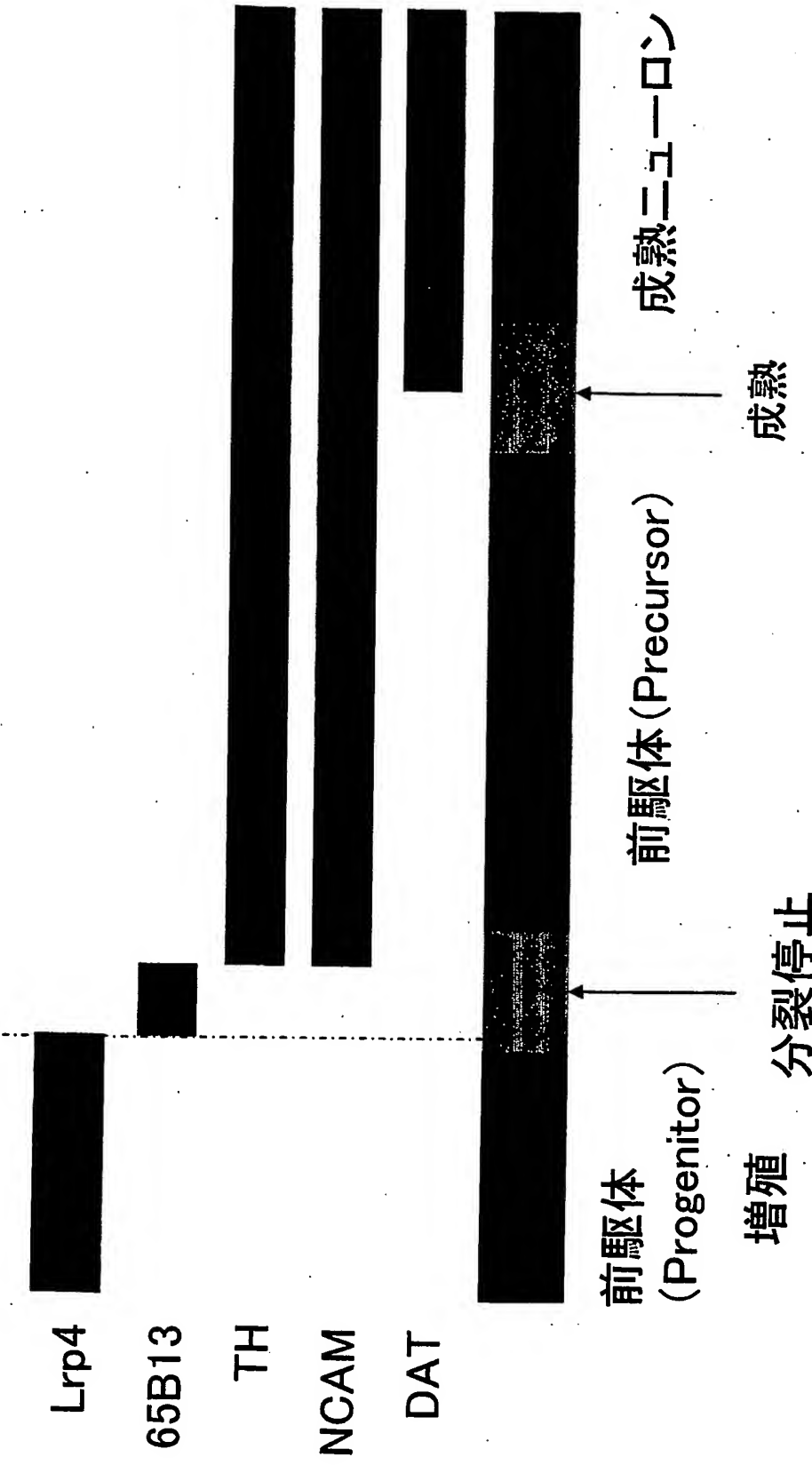


図 6

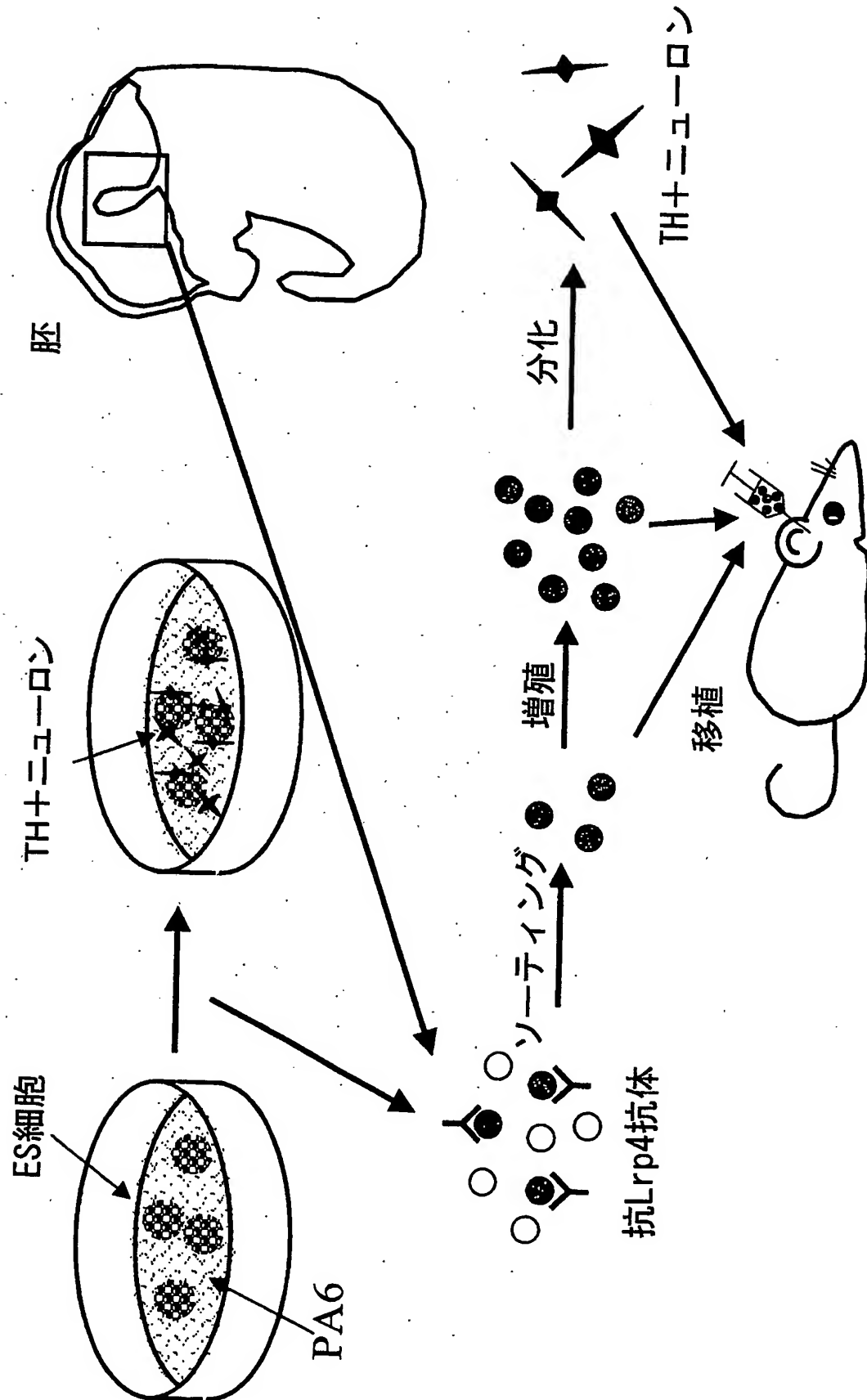
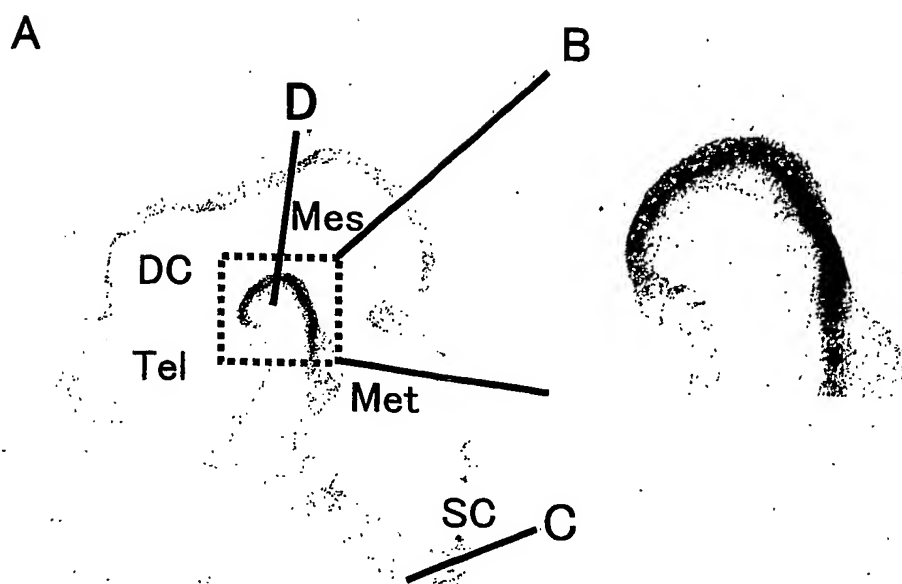


図 7



C. 脊髓



D. 中脳

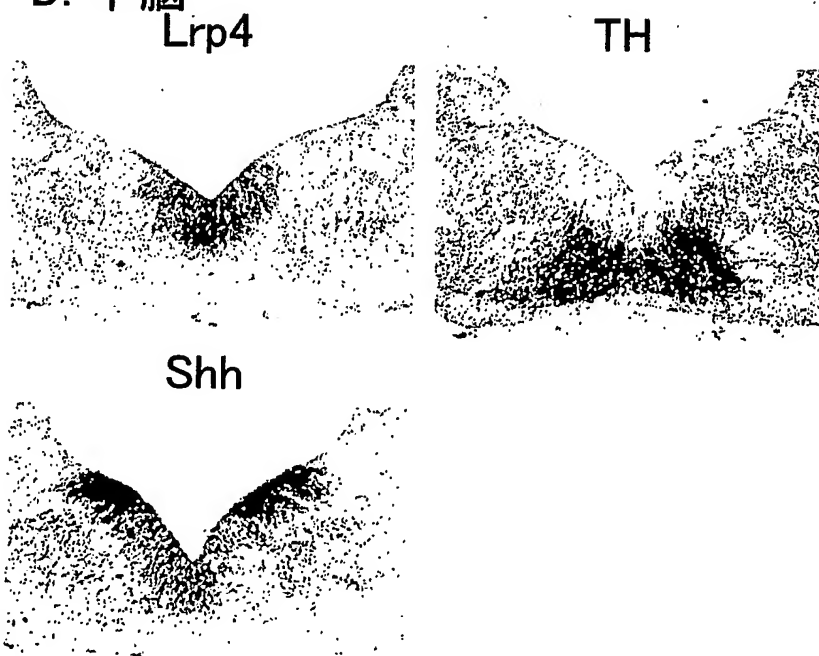
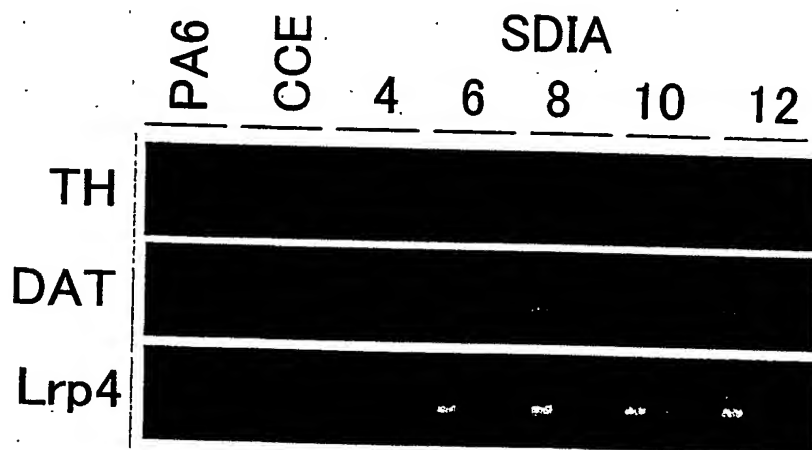
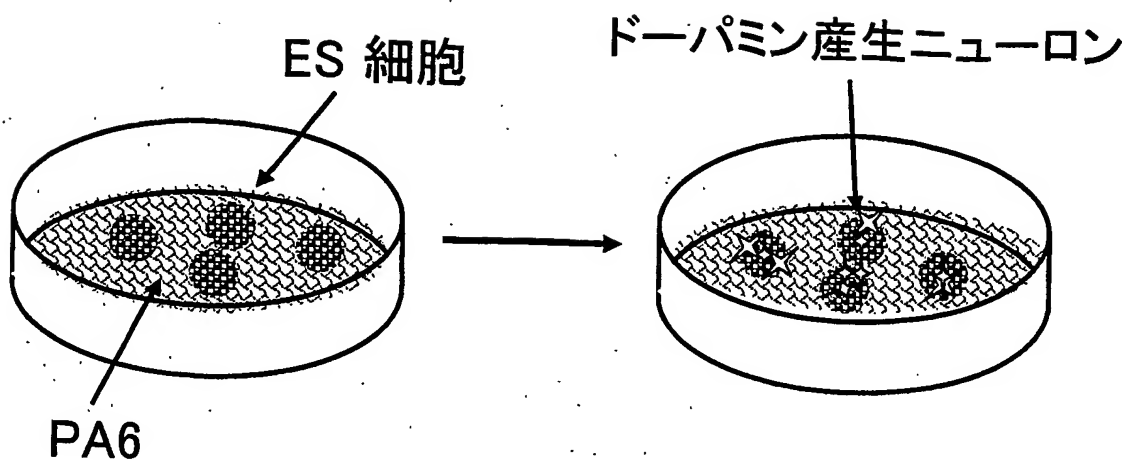


図 8



1 / 3 5

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Lrp4/Corin dopaminergic neuronal marker

<130> E1-A0211P

<150> JP 2003-016790

<151> 2003-01-24

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4864

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

ctagtcccca ggcagacggt ccctcactcc tgtggcttgg cgtcggagac gctggcagtc 60

atgggcaggg tttccttcag cgttcgggtc agctccgtgc ggagagcccg ctgctcttgt 120

cctgggcgat gctacctctc ctgcagagtc cctccaacca ccgccctccg tgcactgaac 180

2 / 3 5

ggctcttggt gcgcgggggt tccgggggag actgcaggtg gagccgtcgg acccggeccc 240

ttggggaccc gtggttcct ctccgggtcc aagttccagg ctcccggcag ctggaaggat 300

tgctttggag ccccgccctgc tccagacgtc ttgagagcag acaggagcgt gggcgagggc 360

tgctctcaga agctggtgac tgctaacttg ctgcgttcc tctgtctggt gctcatcccc 420

tgcattctcg cctcatcgt gctgttgcc atctgtctgt ctttgtggg aacattaata 480

agggtttatt tcaaatcaaa tgacagtga ctttgggtca ctgatgggga agctcgagt 540

cctggtgtta ttctgtaaa tacagtttat tatgagaaca caggggcgcc ctctctgccc 600

cccagccagt cactccagc ctggacaccg agagctcctt ctccagagga ccagagtcac 660

aggaacacaa gcacctgcat gaacatcact cacagccagt gtcaaattct gccctaccac 720

agcacgttgg cacctctctt gccaatgtc aaaaacatgg acatggagaa gttcctcaag 780

ttcttcacgt acctccatcg cctcagttgc tatcaacata tctgtctctt cggctgtagc 840

ctgccttcc ctgagtgcgt tgttgatggc gatgacaggc atggtcttct accctgtaga 900

tctttctgtg aggctgcaaa agaaggatgc gaatctgtcc tgggaatggt gaactcctcc 960

3 / 3 5

tggccggatt ccctcagatg ctctcagttt agggaccaca ctgagactaa cagcagtgtc 1020

agaaagagct gcttctcact gcagcaggaa catggaaagc aatcactctg tggagggggc 1080

gagagcttcc tgtgtaccag cgggctctgc gtccccaaga agctgcagtg taacggctat 1140

aatgactgtg atgactggag cgacgaggcg cattgcaact gcagcaagga tctgtttcac 1200

tgtggcacag gcaagtgcct ccactacagc ctcttgtgtg atgggtacga tgactgtggg 1260

gacccgagtg acgagcaaaa ctgtgattgt aatctcaca aagagcatcg ctgtggagat 1320

gggcgctgca ttgcggctga gtgggtgtgc gatggggacc atgactgtgt ggacaagtct 1380

gatgagggtca actgctcttg tcacagccag ggcctggtgg aatgcacaag tggacagtgc 1440

atccctagca ccttcagtg tgatggggac gaagactgta aggatgggag tgacgaggag 1500

aactgcagtg acagtcagac gccatgtcca gaaggagaac agggatgctt tggcagttcc 1560

tgcgtcgaat cctgtgctgg tagctctctg tgtgactcag acagcagcct gagtaactgc 1620

agtcaatgtg agcccatcac tttggaactc tgcatgaatt tgctctacaa ccatacacat 1680

tatccaaatt accttggcca cagaactcaa aaggaagcgt ccatcagctg ggagtcaccc 1740

4 / 3 5

cttttcctg ccctgtaca aaccaactgt tacaaatacc tcatgttttt cgcttgcacc 1800

attttggttc caaagtgtga tgtgaataca ggacaacgca tcccgcttg cagactcctg 1860

tgtgagcact ccaaagagcg ctgtgagtct gttctgggaa tcgttggcct gcagtggcct 1920

gaagacaccg actgcaatca atttcagag gaaagttcag acaatcaaac ttgcctcctg 1980

cccaatgaag atgtggaaga atgctctccg agtcacttca aatgccgctc gggacgatgc 2040

gttctgggct ccaggagatg tgacggccag gctgactgtg acgacgacag tgacgaggag 2100

aactgtggtt gtaaagagag agctctttgg gaatgtccat ttaataagca atgtctgaag 2160

catacattaa tctgcgatgg gtttccagat tgtccagaca gtatggatga aaaaaactgc 2220

tcattttgcc aagacaatga gctggaatgt gccaaccatg agtgtgtgcc gcgtgacctt 2280

tggtgcgacg gatgggtcga ctgctcagac agttctgatg aatggggctg tgtgaccctc 2340

tctaaaaatg ggaactcctc ctcatgtctg actgttcaca aatctgcaa ggaacaccac 2400

gtgtgtgctg acggctggcg ggagacgttg agtcagctgg cctgcaagca gatgggttta 2460

ggagaaccgt ctgtgaccaa gctgatccca ggacaggaag gccagcagtg gctgaggttg 2520

5 / 3 5

taccccaact gggagaatct caatgggagc accttgcagg agctgctggt atacaggcac 2580

tcctgcccac gcagaagtga gatttccctt ctgtgctcca agcaagactg tggccgccgc 2640

cctgctgccc gaatgaacaa gaggatcctt gggggtcgga ctagtcgtcc tgggaggtgg 2700

ccgtggcagt gctctctgca gagtgaaccc agtggacata tctgtggctg tgtcctcatt 2760

gccaagaagt gggtcctgac agttgcccat tgctttgaag ggagagaaga cgctgatggt 2820

tggaagtgg tatttggcat aaacaacctg gaccatccat caggcttcat gcagaccgcg 2880

tttgtgaaga ccacctgct acatccccgt tacagtcgag cagtggtaga ctatgatatc 2940

agcgtggtgg agctgagcga tgatatcaat gagacaagct acgtcagacc tgtctgccta 3000

cccagtcggg aggagtatct agaaccagat acgtactgct acatcacagg ctggggccac 3060

atgggcaata aaatgccctt taagctgcag gagggagagg tccgcattat ccctctggag 3120

cagtgccagt cctatittga catgaagacc atcaccaatc ggatgatctg tgctggctat 3180

gagtctggca ccgtggactc ctgcatggga gacagcgggt ggcctctggt ttgtgaacga 3240

cccggaggac agtggacatt atttggttta acttcatggg gctccgtctg cttttccaaa 3300

6 / 3 5

gttctgggac ctggagtgt cagcaatgtg tcttactttg tgggctggat tgaaagacaa 3360

atatatatcc agacctttct ccaaaagaaa tcccaaggat aatcagagac tttgtgggga 3420

aacctacatg gagaatgacc ctctgaaaca gaagcttgct ctgccaagag ctgtacgaac 3480

aggcgtttca cggacaggac gctcaacatg caccgcaaga tctctcctgt ttgtgctaga 3540

tgagttttac tcaggcttta atctctttca acattatcat ttattaattt catgaatcct 3600

tttaaaagca cagagcaaag taggttttgt tattttgcta ggctaacctt gaatgtagtg 3660

tgcaattacc aacccataga gacatttgga gctctagggt aacaagttat agaaagctcc 3720

ttttattact actacaagac acacacggag atacacgctg actgatctcc agtttctgct 3780

taagcccagt ggcttagggg gcacatttca gaactgatct tggagactgg cttttaattt 3840

gtagaaagcc aagagaatat atatgctttt attatttact ctactcttct aaataacttg 3900

aagaaatcat gaaagacaga gaaaggaccc acagtgttga tctagacagt tgaagttgca 3960

agaatgtaaa attctctagc caaccaaact aacactctga agtaagtaga attctatcct 4020

ttctgtattc aaattaagct taaaatctcc accagatttg ttcccgttac tgggaatttt 4080

7 / 3 5

cggagtatgt cacttagatg actgtgatgt caaaagccag gtcaatcctt gaggaataa 4140

tttgtttgct tatgtgggaa tgaataagaa tctttccatt ccgcaaaaca cacaaattaa 4200

aaaggagaaa aaaaattaaa taacattcca cacccaatta attctgaaaa ttagtctgct 4260

tgtattcacc caaaacagaa aagttacaga aatatatttc aaagtcagc aaaatgttgc 4320

atggagtata taacattttg caatttcccc ctcatgatgt ctaacatccg gtattgccat 4380

ttgcctcatt gataattaaa actaaatttt aaggatgctt ttaagcactg ggccacttta 4440

tgggaatcaa ttcccaaagc aattagtgtg tacaagtatt ttttccact aaaaagtttc 4500

aaaacacaaa ccttcatact aaattaatta gccagacatg aactatgtaa catgcaaag 4560

cctttttgaa caagtaggat gcaactgttaa acttcaccag caaccaaact gcctcagtat 4620

tgcttacagg gactacctgc aattttatat gtgtattttg tactcttttt ctagatagtt 4680

caaatgcaaa acattgtttc aaccctatt ctccatgttg ttcacctctt gtcctggaat 4740

ttgttacaaa gtgtgtgtag caaatgattg tactgcggtc aggactatat gaaggtttag 4800

gaccatcggg tcggttttgt tataattgtt ggcacataat taataaaata tttttagcat 4860

8 / 3 5

tggg

4864

<210> 2

<211> 4933

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

aaatcatccg tagtgcctcc ccgggggaca cgtagaggag agaaaagcga ccaagataaa 60

agtggacaga agaataagcg agacttttta tccatgaaac agtctcctgc cctcgctccg 120

gaagagcgct accgcagagc cgggtcccca aagccggtct tgagagctga tgacaataac 180

atgggcaatg gctgctctca gaagctggcg actgctaacc tcctccggtt cctattgctg 240

gtcctgattc catgtatctg tgctctcggt ctcttgctgg tgatcctgct ttcctatggt 300

ggaacattac aaaaggtcta ttttaaatca aatgggagtg aacctttggt cactgatggt 360

gaaatccaag ggtccgatgt tattcttaca aatacaattt ataaccagag cactgtgggtg 420

tctactgcac atcccgacca acaogttcca gcctggacta cggatgcttc tctcccaggg 480

9 / 3 5

gaccaaagtc acaggaatac aagtcctgt atgaacatca cccacagcca gtgtcagatg 540

ctgccctacc acgccacgct gacacctctc ctctcagttg tcagaaacat ggaaatggaa 600

aagttcctca agtttttcac atatctccat cgcctcagtt gctatcaaca tatcatgctg 660

tttggtgta cctcgcctt ccctgagtgc atcattgatg gcgatgacag tcatggactc 720

ctgccctgta ggtccttctg tgaggctgca aaagaaggct gtgaatcagt cctggggatg 780

gtgaattact cctggccgga tttcctcaga tgctcccagt ttagaaacca aactgaaagc 840

agcaatgtca gcagaatttg cttctcacct cagcaggaaa acggaaagca attgctctgt 900

ggaaggggtg agaactttct gtgtgccagt ggaatctgca tccccgggaa actgcaatgt 960

aatggctaca acgactgtga cgactggagt gacgaggctc attgcaactg cagcgagaat 1020

ctgtttcact gtcacacagg caagtcctt aattacagcc ttgtgtgtga tggatatgat 1080

gactgtgggg atttgagtga tgagcaaaac tgtgattgca atcccacaac agagcatcgc 1140

tgcggggacg ggcgctgcat cgccatggag tgggtgtgtg atggtgacca cgactgtgtg 1200

gataagtccg acgaggtcaa ctgctcctgt cacagccagg gtctggtgga atgcagaaat 1260

10 / 35

ggacaatgta tccccagcac gtttcaatgt gatggtgacg aggactgcaa ggatgggagt 1320

gatgaggaga actgcagcgt cattcagact tcatgtcaag aaggagacca aagatgcctc 1380

tacaatccct gccttgatc atgtggtggt agctctctct gtgaccgaa caacagtctg 1440

aataactgta gtcaatgtga accaattaca ttggaactct gcatgaattt gccctacaac 1500

agtacaagtt atccaaatta ttttggccac aggactcaaa aggaagcatc catcagctgg 1560

gagtcttctc ttttccctgc acttggtcaa accaactggt ataaatacct catgttcttt 1620

tcttgacca ttttgggtacc aaaatgtgat gtgaatacag gcgagcgtat ccctccttgc 1680

agggcattgt gtgaacactc taaagaacgc tgtgagtctg ttcttgggat tgtgggccta 1740

cagtggcctg aagacacaga ttgcagtcaa tttccagagg aaaattcaga caatcaaacc 1800

tgctgatgc ctgatgaata tgtggaagaa tgctcaccta gtcatttcaa gtgccgctca 1860

ggacagtgtg ttctggcttc cagaagatgt gatggccagg ccgactgtga cgatgacagt 1920

gatgaggaaa actgtggttg taaagagaga gatctttggg aatgtccatc caataaaca 1980

tgtttgaagc acacagtgat ctgcgatggg ttccagact gccctgatta catggacgag 2040

11 / 35

aaaaactgct cattttgcca agatgatgag ctggaatgtg caaaccatgc gtgtgtgtca 2100

cgtgacctgt ggtgtgatgg tgaagccgac tgctcagaca gttcagatga atgggactgt 2160

gtgaccctct ctataaatgt gaactcctct tcctttctga tggttcacag agctgccaca 2220

gaacaccatg tgtgtgcaga tggctggcag gagatattga gtcagctggc ctgcaagcag 2280

atgggttttag gagaaccatc tgtgaccaa ttgatacagg aacaggagaa agagccgcgg 2340

tggctgacat tacactcaa ctgggagagc ctcaatggga ccactttaca tgaacttcta 2400

gtaaatgggc agtcttgtga gagcagaagt aaaatttctc ttctgtgtac taaacaagac 2460

tgtgggcgcc gccctgctgc ccgaatgaac aaaaggatcc ttggaggtcg gacgagtcgc 2520

cctggaaggt ggccatggca gtgttctctg cagagtgaac ccagtggaca tatctgtggc 2580

tgtgtcctca ttgccaagaa gtgggttctg acagttgcc actgcttcga ggggagagag 2640

aatgctgcag tttggaaagt ggtgcttggc atcaacaatc tagaccatcc atcagtgttc 2700

atgcagacac gctttgtgaa gaccatcatc ctgcatcccc gctacagtcg agcagtgggtg 2760

gactatgaca tcagcatcgt tgagctgagt gaagacatca gtgagactgg ctacgtccgg 2820

1 2 / 3 5

cctgtctgct tgcccaaccc ggagcagtgg ctagagcctg acacgtactg ctatatcaca 2880

ggctggggcc acatgggcaa taaaatgcc aattaagctgc aagagggaga ggtccgcatt 2940

atttctctgg aacattgtca gtctacttt gacatgaaga ccaccaccac tcggatgata 3000

tgtgctggct atgagtctgg cacagttgat tcatgcatgg gtgacagcgg tgggcctctt 3060

gtttgtgaga agcctggagg acggtggaca ttatttggat taacttcatg gggctccgtc 3120

tgcttttcca aagtctggg gccctggcgtt tatagtaatg tgtcatattt cgtcgaatgg 3180

attaaaagac agatttacat ccagacctt ctcctaaact aattataagg atgacagag 3240

acttttgcca gctacactaa aagaaaatgg ctttcttgac tgtgaagagc tgcctgcaga 3300

gagctgtaca gaagcacttt tcatggacag aaatgctcaa tcgtgcactg caaatttgca 3360

tgtttgtttt ggactaattt ttttcaattt attttttcac cttcattttt ctcttatttc 3420

aagttcaatg aaagacttta caaaagcaaa caaagcagac tttgtccttt tgccaggcct 3480

aaccatgact gcagcacaaa attatcgact ctggcgagat ttaaaatcag gtgctacagt 3540

aacaggttat ggaatggtct cttttatcct atcacaaaaa aagacataga tatttaggct 3600

13 / 35

gattaattat ctctaccagt ttttgtttct caagctcagt gcatagtggg aaatttcagt 3660

gttaacattg gagacttgct tttctttttc tttttttata cccacaatt cttttttatt 3720

acacttcgaa ttttagggta cagagcaca acgtgcagg tagttacata tgtatacatg 3780

tgccatgttg gtgtgctgaa ccagtaact cgtcatttga tttattaaaa gccaaagataa 3840

tttcatgtt taaagtattt actattacc ccttctaag tttgcataat tctgagaact 3900

gataaaagac agcaataaaa gaccagtgtc atccatttag gtagcaagac atattgaatg 3960

caaagttctt tagatatcaa tattaacact tgacattatt ggacccccca ttctggatgt 4020

atatcaagat cataatttta tagaagagtc tctatagaac tgcctcata gctgggtttg 4080

ttcaggatat atgagttggc tgattgagac tgcaacaact acatctatat ttatgggcaa 4140

tattttgttt tacttatgtg gcaaagaact ggatattaaa ctttgcaaaa gagaatttag 4200

atgagagatg caatttttta aaaagaaaat taatttgcac cctcgttta attaaattta 4260

tttttcagtt ttcttgcggt catccatacc aacaaagtca taaagagcat attttagagc 4320

acagtaagac ttgcatgga gtaaaacatt ttgtaatttt cctcaaaaga tgtttaatat 4380

1 4 / 3 5

ctggtttctt ctcatggta attaaaattt tagaaatgat ttttagctct aggccacttt 4440

acgcaactca atttctgaag caattagtgg taaaaagtat ttttccccac taaaaaactt 4500

taaaacacaa atcttcatat atacttaatt taattagtca ggcattccatt ttgcctttta 4560

aacaactagg attccctact aacctccacc agcaacctgg actgcctcag cattccaaat 4620

agatactacc tgcaatttta tacatgtatt tttgtatctt ttctgtgtgt aaacatagtt 4680

gaaattcaaa aagttgtagc aatttctata ctattcatct cctgtccttc agtttgtata 4740

aacctaagga gagtgtgaaa tccagcaact gaattgtggt cacgattgta tgaaagttca 4800

agaacatatg tcagttttgt tacagttgta gctacatact caatgtatca acttttagcc 4860

tgctcaactt aggctcagtg aaatatatat attatactta ttttaaataa ttcttaatac 4920

aaataaaatg gta 4933

<210> 3

<211> 1113

<212> PRT

<213> Mus musculus

1 5 / 3 5

<400> 3

Met Gly Arg Val Ser Phe Ser Val Arg Val Ser Ser Val Arg Arg Ala

1

5

10

15

Arg Cys Ser Cys Pro Gly Arg Cys Tyr Leu Ser Cys Arg Val Pro Pro

20

25

30

Thr Thr Ala Leu Arg Ala Leu Asn Gly Leu Gly Cys Ala Gly Val Pro

35

40

45

Gly Glu Thr Ala Gly Gly Ala Val Gly Pro Gly Pro Leu Gly Thr Arg

50

55

60

Gly Phe Leu Ser Gly Ser Lys Phe Gln Ala Pro Gly Ser Trp Lys Asp

65

70

75

80

Cys Phe Gly Ala Pro Pro Ala Pro Asp Val Leu Arg Ala Asp Arg Ser

85

90

95

Val Gly Glu Gly Cys Pro Gln Lys Leu Val Thr Ala Asn Leu Leu Arg

100

105

110

Phe Leu Leu Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Ile Val Leu

115

120

125

Leu Ala Ile Leu Leu Ser Phe Val Gly Thr Leu Lys Arg Val Tyr Phe

1 6 / 3 5

130

135

140

Lys Ser Asn Asp Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ala Arg Val

145

150

155

160

Pro Gly Val Ile Pro Val Asn Thr Val Tyr Tyr Glu Asn Thr Gly Ala

165

170

175

Pro Ser Leu Pro Pro Ser Gln Ser Thr Pro Ala Trp Thr Pro Arg Ala

180

185

190

Pro Ser Pro Glu Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Thr Cys Met Asn

195

200

205

Ile Thr His Ser Gln Cys Gln Ile Leu Pro Tyr His Ser Thr Leu Ala

210

215

220

Pro Leu Leu Pro Ile Val Lys Asn Met Asp Met Glu Lys Phe Leu Lys

225

230

235

240

Phe Phe Thr Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Leu Leu

245

250

255

Phe Gly Cys Ser Leu Ala Phe Pro Glu Cys Val Val Asp Gly Asp Asp

260

265

270

17 / 35

Arg His Gly Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu

275

280

285

Gly Cys Glu Ser Val Leu Gly Met Val Asn Ser Ser Trp Pro Asp Ser

290

295

300

Leu Arg Cys Ser Gln Phe Arg Asp His Thr Glu Thr Asn Ser Ser Val

305

310

315

320

Arg Lys Ser Cys Phe Ser Leu Gln Gln Glu His Gly Lys Gln Ser Leu

325

330

335

Cys Gly Gly Gly Glu Ser Phe Leu Cys Thr Ser Gly Leu Cys Val Pro

340

345

350

Lys Lys Leu Gln Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp

355

360

365

Glu Ala His Cys Asn Cys Ser Lys Asp Leu Phe His Cys Gly Thr Gly

370

375

380

Lys Cys Leu His Tyr Ser Leu Leu Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly

385

390

395

400

Asp Pro Ser Asp Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Leu Thr Lys Glu His

405

410

415

18 / 35

Arg Cys Gly Asp Gly Arg Cys Ile Ala Ala Glu Trp Val Cys Asp Gly

420

425

430

Asp His Asp Cys Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His

435

440

445

Ser Gln Gly Leu Val Glu Cys Thr Ser Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr

450

455

460

Phe Gln Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu

465

470

475

480

Asn Cys Ser Asp Ser Gln Thr Pro Cys Pro Glu Gly Glu Gln Gly Cys

485

490

495

Phe Gly Ser Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Gly Ser Ser Leu Cys Asp

500

505

510

Ser Asp Ser Ser Leu Ser Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu

515

520

525

Glu Leu Cys Met Asn Leu Leu Tyr Asn His Thr His Tyr Pro Asn Tyr

530

535

540

Leu Gly His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser

19 / 35

545

550

555

560

Leu Phe Pro Ala Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe

565

570

575

Phe Ala Cys Thr Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Gln

580

585

590

Arg Ile Pro Pro Cys Arg Leu Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys

595

600

605

Glu Ser Val Leu Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp

610

615

620

Cys Asn Gln Phe Pro Glu Glu Ser Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Leu

625

630

635

640

Pro Asn Glu Asp Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg

645

650

655

Ser Gly Arg Cys Val Leu Gly Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp

660

665

670

Cys Asp Asp Asp Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Ala

675

680

685

20 / 35

Leu Trp Glu Cys Pro Phe Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Leu Ile

690

695

700

Cys Asp Gly Phe Pro Asp Cys Pro Asp Ser Met Asp Glu Lys Asn Cys

705

710

715

720

Ser Phe Cys Gln Asp Asn Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Glu Cys Val

725

730

735

Pro Arg Asp Leu Trp Cys Asp Gly Trp Val Asp Cys Ser Asp Ser Ser

740

745

750

Asp Glu Trp Gly Cys Val Thr Leu Ser Lys Asn Gly Asn Ser Ser Ser

755

760

765

Leu Leu Thr Val His Lys Ser Ala Lys Glu His His Val Cys Ala Asp

770

775

780

Gly Trp Arg Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu

785

790

795

800

Gly Glu Pro Ser Val Thr Lys Leu Ile Pro Gly Gln Glu Gly Gln Gln

805

810

815

Trp Leu Arg Leu Tyr Pro Asn Trp Glu Asn Leu Asn Gly Ser Thr Leu

820

825

830

21 / 35

Gln Glu Leu Leu Val Tyr Arg His Ser Cys Pro Ser Arg Ser Glu Ile

835

840

845

Ser Leu Leu Cys Ser Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg

850

855

860

Met Asn Lys Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp

865

870

875

880

Pro Trp Gln Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly

885

890

895

Cys Val Leu Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe

900

905

910

Glu Gly Arg Glu Asp Ala Asp Val Trp Lys Val Val Phe Gly Ile Asn

915

920

925

Asn Leu Asp His Pro Ser Gly Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr

930

935

940

Ile Leu Leu His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile

945

950

955

960

Ser Val Val Glu Leu Ser Asp Asp Ile Asn Glu Thr Ser Tyr Val Arg

2 2 / 3 5

965

970

975

Pro Val Cys Leu Pro Ser Pro Glu Glu Tyr Leu Glu Pro Asp Thr Tyr

980

985

990

Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys

995

1000

1005

Leu Gln Glu Gly Glu Val Arg Ile Ile Pro Leu Glu Gln Cys Gln

1010

1015

1020

Ser Tyr Phe Asp Met Lys Thr Ile Thr Asn Arg Met Ile Cys Ala

1025

1030

1035

Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly

1040

1045

1050

Gly Pro Leu Val Cys Glu Arg Pro Gly Gly Gln Trp Thr Leu Phe

1055

1060

1065

Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly

1070

1075

1080

Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser Tyr Phe Val Gly Trp Ile Glu

1085

1090

1095

23 / 35

Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu Gln Lys Lys Ser Gln Gly

1100

1105

1110

<210> 4

<211> 1042

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Gln Ser Pro Ala Leu Ala Pro Glu Glu Arg Tyr Arg Arg Ala

1

5

10

15

Gly Ser Pro Lys Pro Val Leu Arg Ala Asp Asp Asn Asn Met Gly Asn

20

25

30

Gly Cys Ser Gln Lys Leu Ala Thr Ala Asn Leu Leu Arg Phe Leu Leu

35

40

45

Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Val Leu Leu Leu Val Ile

50

55

60

Leu Leu Ser Tyr Val Gly Thr Leu Gln Lys Val Tyr Phe Lys Ser Asn

65

70

75

80

Gly Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ile Gln Gly Ser Asp Val

2 4 / 3 5

85

90

95

Ile Leu Thr Asn Thr Ile Tyr Asn Gln Ser Thr Val Val Ser Thr Ala

100

105

110

His Pro Asp Gln His Val Pro Ala Trp Thr Thr Asp Ala Ser Leu Pro

115

120

125

Gly Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Ala Cys Met Asn Ile Thr His

130

135

140

Ser Gln Cys Gln Met Leu Pro Tyr His Ala Thr Leu Thr Pro Leu Leu

145

150

155

160

Ser Val Val Arg Asn Met Glu Met Glu Lys Phe Leu Lys Phe Phe Thr

165

170

175

Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Met Leu Phe Gly Cys

180

185

190

Thr Leu Ala Phe Pro Glu Cys Ile Ile Asp Gly Asp Asp Ser His Gly

195

200

205

Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu Gly Cys Glu

210

215

220

25 / 35

Ser Val Leu Gly Met Val Asn Tyr Ser Trp Pro Asp Phe Leu Arg Cys

225

230

235

240

Ser Gln Phe Arg Asn Gln Thr Glu Ser Ser Asn Val Ser Arg Ile Cys

245

250

255

Phe Ser Pro Gln Gln Glu Asn Gly Lys Gln Leu Leu Cys Gly Arg Gly

260

265

270

Glu Asn Phe Leu Cys Ala Ser Gly Ile Cys Ile Pro Gly Lys Leu Gln

275

280

285

Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp Glu Ala His Cys

290

295

300

Asn Cys Ser Glu Asn Leu Phe His Cys His Thr Gly Lys Cys Leu Asn

305

310

315

320

Tyr Ser Leu Val Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly Asp Leu Ser Asp

325

330

335

Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Pro Thr Thr Glu His Arg Cys Gly Asp

340

345

350

Gly Arg Cys Ile Ala Met Glu Trp Val Cys Asp Gly Asp His Asp Cys

355

360

365

26 / 35

Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His Ser Gln Gly Leu

370

375

380

Val Glu Cys Arg Asn Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr Phe Gln Cys Asp

385

390

395

400

Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ser Val

405

410

415

Ile Gln Thr Ser Cys Gln Glu Gly Asp Gln Arg Cys Leu Tyr Asn Pro

420

425

430

Cys Leu Asp Ser Cys Gly Gly Ser Ser Leu Cys Asp Pro Asn Asn Ser

435

440

445

Leu Asn Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu Glu Leu Cys Met

450

455

460

Asn Leu Pro Tyr Asn Ser Thr Ser Tyr Pro Asn Tyr Phe Gly His Arg

465

470

475

480

Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Ala

485

490

495

Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe Phe Ser Cys Thr

27 / 35

500

505

510

Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Glu Arg Ile Pro Pro

515

520

525

Cys Arg Ala Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys Glu Ser Val Leu

530

535

540

Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp Cys Ser Gln Phe

545

550

555

560

Pro Glu Glu Asn Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Met Pro Asp Glu Tyr

565

570

575

Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg Ser Gly Gln Cys

580

585

590

Val Leu Ala Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp Cys Asp Asp Asp

595

600

605

Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Asp Leu Trp Glu Cys

610

615

620

Pro Ser Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Val Ile Cys Asp Gly Phe

625

630

635

640

28 / 35

Pro Asp Cys Pro Asp Tyr Met Asp Glu Lys Asn Cys Ser Phe Cys Gln

645

650

655

Asp Asp Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Ala Cys Val Ser Arg Asp Leu

660

665

670

Trp Cys Asp Gly Glu Ala Asp Cys Ser Asp Ser Ser Asp Glu Trp Asp

675

680

685

Cys Val Thr Leu Ser Ile Asn Val Asn Ser Ser Ser Phe Leu Met Val

690

695

700

His Arg Ala Ala Thr Glu His His Val Cys Ala Asp Gly Trp Gln Glu

705

710

715

720

Ile Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu Gly Glu Pro Ser

725

730

735

Val Thr Lys Leu Ile Gln Glu Gln Glu Lys Glu Pro Arg Trp Leu Thr

740

745

750

Leu His Ser Asn Trp Glu Ser Leu Asn Gly Thr Thr Leu His Glu Leu

755

760

765

Leu Val Asn Gly Gln Ser Cys Glu Ser Arg Ser Lys Ile Ser Leu Leu

770

775

780

29 / 35

Cys Thr Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg Met Asn Lys

785 790 795 800

Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp Pro Trp Gln

805 810 815

Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly Cys Val Leu

820 825 830

Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe Glu Gly Arg

835 840 845

Glu Asn Ala Ala Val Trp Lys Val Val Leu Gly Ile Asn Asn Leu Asp

850 855 860

His Pro Ser Val Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr Ile Ile Leu

865 870 875 880

His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile Ser Ile Val

885 890 895

Glu Leu Ser Glu Asp Ile Ser Glu Thr Gly Tyr Val Arg Pro Val Cys

900 905 910

Leu Pro Asn Pro Glu Gln Trp Leu Glu Pro Asp Thr Tyr Cys Tyr Ile

30 / 35

915

920

925

Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys Leu Gln Glu

930

935

940

Gly Glu Val Arg Ile Ile Ser Leu Glu His Cys Gln Ser Tyr Phe Asp

945

950

955

960

Met Lys Thr Ile Thr Thr Arg Met Ile Cys Ala Gly Tyr Glu Ser Gly

965

970

975

Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu

980

985

990

Lys Pro Gly Gly Arg Trp Thr Leu Phe Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser

995

1000

1005

Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser

1010

1015

1020

Tyr Phe Val Glu Trp Ile Lys Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu

1025

1030

1035

1040

Leu Asn

31 / 35

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 5

cagctccaca acctacatca ttccgt

26

<210> 6

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 6

acggaatgat gt

12

3 2 / 3 5

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 7

gtccatcttc tctctgagac tctggt

26

<210> 8

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 8

accagagtct ca

12

3 3 / 3 5

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 9

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 10

acacactcac ag

12

3 4 / 3 5

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 11

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

<210> 12

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 12

actgtcacac tg

12

3 5 / 3 5

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 13

gtcgatgaac ttcgactgtc gatcgt

26

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 14

acgatcgaca gt

12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/28, C12N5/08, C12P21/08, C12Q1/68,
C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/53, A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/28, C12N5/08, C12P21/08, C12Q1/68,
C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/53, A61P25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 99/64608 A1 (Schering AG.), 16 December, 1999 (16.12.99), & EP 1084259 A1 & JP 2002-517253 A	2 1,3-8
X A	WO 01/057194 A2 (Corvas Int Inc.), 09 August, 2001 (09.08.01), & EP 1252300 A2 & US 2003/0119168 A1 & JP 2003-521920 A	2 1,3-8
X A	Hooper, J.D. et al., Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes., Eur.J.Biochem., Vol.267, No.23, pages 6931 to 6937 (2000)	2 1,3-8
X A	WO 00/06700 A1 (Layton Bioscience Inc.), 10 February, 2000 (10.02.00), & EP 1109887 A1	6-8 1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 February, 2004 (20.02.04)

Date of mailing of the international search report
09 March, 2004 (09.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000629

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 6277820 B1 (Genentech Inc.), 21 August, 2001 (21.08.01), (Family: none)	6 1-5
A	Yan, W. et al., Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart., J.Biol.Chem., Vol.274, No.21, pages 14926 to 14935, (1999)	1-8
A	Tomita, Y. et al., A novel low-density lipoprote- in receptor-related protein with type II membrane protein-like structure is abundant in heart., J. Biochem., Vol.124, No.4, pages 784 to 789, (1998)	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000629

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C07K16/28, C12N5/08, C12P21/08, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/53, A61P25/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C07K16/28, C12N5/08, C12P21/08, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/53, A61P25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq,
 WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 99/64608 A1 (Schering AG) 1999.12.16 & EP 1084259 A1 & JP 2002-517253 A	2 1, 3-8
X A	WO 01/057194 A2 (Corvas Int Inc) 2001.08.09 & EP 1252300 A2 & US 2003/0119168 & JP 2003-521920 A	2 1, 3-8
X A	Hooper, J. D. et al., Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes. Eur. J. Biochem., Vol. 267, No. 23, pp. 6931-6937 (2000)	2 1, 3-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.02.2004

国際調査報告の発送日

09.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 00/06700 A1 (Layton Bioscience Inc) 2000.02.10 & EP 1109887 A1	6-8 1-5
X A	US 6277820 B1 (Genentech Inc) 2001.08.21 (ファミリーなし)	6 1-5
A	Yan, W. et al., Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart. J. Biol. Chem., Vol. 274, No. 21, pp. 14926-14935 (1999)	1-8
A	Tomita, Y. et al., A novel low-density lipoprotein receptor-related protein with type II membrane protein-like structure is abundant in heart. J. Biochem., Vol. 124, No. 4, pp. 784-789 (1998)	1-8

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

DESCRIPTION

Lrp4/Corin DOPAMINERGIC NEURON PROLIFERATIVE PROGENITOR CELL MARKERS

5 Technical Field

Lrp4 is identified as a gene expressed in dopaminergic neuron progenitor cells prior to cell cycle exit. Dopaminergic neuron progenitor cells that can be used in transplantation therapy for neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD), can be efficiently isolated by detecting the expression of this gene or transmembrane proteins encoded by this gene.

10

Background Art

The dopamine system is an extremely important system for essential motor regulation, hormone secretion regulation, emotion regulation, and such in the mammalian brain. Thus, abnormalities in dopaminergic neural transmission cause various neural disorders. For example, Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease of the extrapyramidal system that occurs due to specific degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain (Harrison's Principles of Internal Medicine, Vol. 2, 23rd edition, Isselbacher *et al.*, ed., McGraw-Hill Inc., NY (1994), pp. 2275-7). Oral administration of L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) is performed as a primary therapeutic method for Parkinson's disease to compensate for the decrease in the amount of dopamine produced; however, the duration of the effect is known to be unsatisfactory.

More recently, a therapeutic method in which the midbrain ventral region of 6 to 9-week old aborted fetuses containing dopaminergic neuron progenitor cells are transplanted to compensate for the loss of dopaminergic neurons was attempted on Parkinson's disease (US 5690927; Spencer *et al.* (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8; Freed *et al.* (1992) N.Engl. J. Med. 327: 1549-55; Widner *et al.* (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63; Kordower *et al.* (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24; Defer *et al.* (1996) Brain 119: 41-50; Lopez-Lozano *et al.* (1997) Transp. Proc. 29: 977-80). However, in addition to cell supply and ethical issues (Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106; Turner *et al.* (1993) Neurosurg. 33: 1031-7), this method is currently under criticism for various other problems, including risk of infection and contamination, immunological rejection of transplants (Lopez-Lozano *et al.* (1997) Transp. Proc. 29: 977-980; Widner and Brudin (1988) Brain Res. Rev. 13: 287-324), and low survival rates due to fetal tissues' primary dependence on the lipid metabolism rather than glycolysis (Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106).

35 In order to resolve the ethical issues and shortage of supply, methods have been proposed that use, for example, porcine cortex, stria, and midbrain cells (for example, Published

Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-508487, Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-508488 or Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-509034). In these methods, a complex procedure that involves the alteration of cell surface antigens (MHC class I antigens) is required to suppress rejection. A method involving local immunosuppression by simultaneously transplanting Sertoli's cells has been proposed as a method of eliminating transplant rejection (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-509170, Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-501818, Selawry and Cameron (1993) Cell Transplant 2: 123-9). It is possible to obtain transplant cells from relatives that have matching MHCs, bone marrow from other individuals, bone marrow banks, or umbilical cord-blood banks. However, if it were possible to use the patient's own cells, the problem of rejection reactions could be overcome without any laborious procedures and trouble.

Therefore, the use of dopaminergic neurons differentiated *in vitro* from non-neural cells such as embryonic stem (ES) cells and bone marrow interstitial cells, instead of cells from aborted fetuses, as transplant materials is considered to be promising. In actuality, functional dopaminergic neurons were reported to have been formed by transplanting ES cells to lesion stria of a rat Parkinson's disease model (Kim *et al.* (2002) Nature 418: 50-56). It is believed that the importance of regenerative therapy from ES cells or the patient's own nerve stem cells will increase in the future.

In the treatment of damage to nerve tissue, it is necessary to reconstruct brain function, and in order to form a suitable link with surrounding cells (network formation), it is necessary to transplant immature cells, cells capable of differentiating *in vivo* into neurons. In the transplanting of neuron progenitor cells, in addition to the aforementioned problem regarding supply, there is also the possibility of the progenitor cells differentiating into groups of heterogeneous cells. For example, in treating Parkinson's disease, it is necessary to selectively transplant catecholamine-containing neurons that produce dopamine. Examples of transplant cells that have been proposed in the past for use in the treatment of Parkinson's disease include striatum (Lindvall *et al.* (1989) Arch. Neurol. 46: 615-31; Widner *et al.* (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63), immortalized cell lines derived from human fetal neurons (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 8-509215; Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-506930; Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-522070), human postmitotic neurons derived from NT2Z cells (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 9-5050554), primordial neuron cells (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-509729), cells and bone marrow stroma cells transfected with exogenous genes so as to produce catecholamines such as dopamines (Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-504503;

Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-513545), and genetically engineered ES cells (Kim *et al.* (2002) Nature 418: 50-56). However, none of these contain only dopaminergic neurons or cells that differentiate into dopaminergic cells.

A method has been proposed for selectively concentrating and isolating dopaminergic neurons from undifferentiated cell populations. In this method, a reporter gene that expresses a fluorescent protein is introduced into each cell of the cell population, under the control of a promoter/enhancer of genes, such as the tyrosine hydroxylase (TH) expressed in dopaminergic neurons, and then cells that emit fluorescence are isolated. The dopaminergic neurons are visualized in their viable state, and concentrated, isolated, and identified (Unexamined Published Japanese Patent Application No. 2002-51775). This method requires the complicated step of introducing an exogenous gene, and further, the presence of a reporter gene poses problems of toxicity and immunogenicity when used in conjunction with gene therapy.

Disclosure of the Invention

One of the major problems in Parkinson's disease (PD) transplantation therapy at the moment is that both *in vitro* differentiated dopaminergic neuron precursor cells and midbrain ventral region of aborted fetuses are mixtures of a myriad of cell types. When considering the safety in neural circuit formation, it is preferable to use isolated cells that comprise only the cell type of interest. Furthermore, when considering the risk of tumorigenesis, it is believed that it would be better to use isolated postmitotic neuron. Moreover, when considering the survival of cells at their transplantation site in the brain, and their ability to properly form a network, it is expected that therapeutic effects can be further improved by isolating progenitor cells at as early a stage as possible. Therefore, the inventors of the present invention aimed to isolate a gene specific to dopaminergic neuron progenitor cells. A novel gene 65B13 has already been successfully isolated and applied for patent (Japanese Patent Application No. 2002-307573) as a gene transiently expressed in neuron progenitor cells immediately after cell cycle exit.

In order to isolate genes specific for dopaminergic neuron progenitor cells, a gene specifically expressed in the most ventral region of the E12.5 murine midbrain containing dopaminergic neurons was identified using a modification ("Method for Homogenizing the Amounts of DNA Fragments and Subtraction Method", Japanese Patent Application No. 2001-184757 (filing date: June 19, 2001)) of the subtraction method (N-RDA: Representational Difference Analysis; RDA (Listsyn N.A. (1995) Trends Genet. 11: 303-7) by additionally dividing the ventral region into two regions in the dorsoventral direction. One of the isolated fragments was a cDNA fragment encoding Lrp4/Corin. Lrp4 encodes a type II transmembrane protein (Fig. 1).

As a result of expression analysis by *in situ* hybridization, Lrp4 was found to be

specifically expressed in dopaminergic neuron proliferative progenitor cells in the midbrain (Figs. 4 and 5). Lrp4 is expressed in the heart from the fetal period to adulthood, and is a type II transmembrane protease which is thought to cleave atrial natriuretic peptides (ANP), a blood pressure-regulating hormone. ANP are expressed as pro-ANP, and, after being secreted outside the cells, are cleaved by Lrp4 on the surface of the cell membrane resulting in active ANP. There have been no previous reports of genes encoding membrane proteins specifically expressed in proliferating dopaminergic neuron progenitor cells. Antibodies to Lrp4 protein expressed on the cell membrane surface are believed to be extremely effective in isolating Lrp4-expressing cells. For example, pure dopaminergic neuron progenitor cells can be obtained by isolating Lrp4-expressing cells from the midbrain ventral region or cultured cells containing dopaminergic neurons differentiated *in vitro*, using anti-Lrp4 antibodies (Fig. 6).

Moreover, the progenitor cells can also be transplanted directly or after having been grown *in vitro*. The progenitor cells of the present invention also have the potential to differentiate and mature at the optimum location in the brain, as well as the potential to additionally grow *in vivo*, and can be expected to demonstrate long-term therapeutic effects. In addition, if Lrp4-expressing cells are transplanted after having differentiated and matured *in vitro*, they can be expected to demonstrate therapeutic effects even if for some reason they do not differentiate into dopaminergic neurons *in vivo*. In consideration of the risks of tumorigenesis and such, an even higher degree of safety can be expected if cells that have been isolated using a postmitotic neuron marker such as 65B13 after differentiating Lrp4-expressing cells grown *in vitro* are transplanted. The use of Lrp4-expressing cells for transplantation therapy after being isolated regardless of the method enables a high degree of safety since only the cell type of interest is isolated. In addition, since the earliest progenitor cells can be used, high therapeutic efficacy can be expected in terms of their survival rate, network formation ability, and such. Further, even if the best therapeutic effects cannot be achieved by these early progenitor cells immediately after isolation, since progenitor cells isolated using a marker of the present invention can mature *in vitro* by culturing or such, materials in the optimum stage of differentiation can be prepared (Fig. 6).

On the other hand, pure dopaminergic neuron progenitor cells are also useful in the search of therapeutic targets for Parkinson's disease, such as for use in the isolation of genes specific to dopaminergic neurons. In particular, being able to obtain proliferative progenitor cells is useful for research on the maturation process of dopaminergic neurons, screening systems using maturation as an index, drug screening in which progenitor cells are grown *in vitro* or *in vivo*, screening for drugs that induce differentiation of progenitor cells *in vivo* (*in vivo* regenerative therapy drugs), and the like.

More specifically, the present invention relates to:

- [1] a dopaminergic neuron proliferative progenitor cell marker polynucleotide probe comprising a sequence selected from the following nucleotide sequences (1) to (5):
- (1) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2;
 - (2) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - (3) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence encoding a sequence lacking a transmembrane domain in an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - (4) a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2; and,
 - (5) a nucleotide sequence comprising at least 15 contiguous nucleotides selected from sequences of (1) to (4),
- [2] an antibody against a polypeptide selected from the following (1) to (6):
- (1) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2;
 - (2) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - (3) a polypeptide comprising an amino acid sequence lacking a transmembrane domain in an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - (4) a polypeptide comprising an amino acid sequence with a deletion, insertion, substitution, or addition of one or more amino acids in an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - (5) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions with a sequence complementary to a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2; and,
 - (6) a polypeptide that is a fragment of a polypeptide of (1) to (5) comprising at least 8 amino acid residues,
- [3] a method of selecting a dopaminergic neuron proliferative progenitor cell, wherein the method comprises the step of contacting the polynucleotide of [1] with a cell sample thought to comprise a dopaminergic neuron progenitor cell,
- [4] a method of selecting a dopaminergic neuron proliferative progenitor cell, wherein the method comprises the step of contacting the antibody of [2] with a cell sample thought to comprise a dopaminergic neuron progenitor cell,
- [5] a method of selecting a dopaminergic neuron proliferative progenitor cell comprising the steps of:
- (1) selecting a dopaminergic neuron progenitor cell using the method of selecting a dopaminergic neuron progenitor cell of [3] or [4];
 - (2) culturing the progenitor cell selected in (1); and,
 - (3) screening the progenitor cell cultured in (2) using a postmitotic neuron marker,
- [6] a dopaminergic neuron proliferative progenitor cell prior to cell cycle exit selected using the method of any one of [3] to [5],

[7] a method of isolating a gene specific to a dopaminergic neuron progenitor cell and a gene specific to each maturation stage of the progenitor cell differentiating into a dopaminergic neuron, wherein the method comprises the step of detecting and isolating a gene specifically expressed in the progenitor cell of [6], or a cell differentiated, induced, or proliferated from the progenitor cell, and

[8] a method of screening using maturation as an index, wherein the method comprises the steps of contacting a test substance with the progenitor cell of [6], and detecting the differentiation or proliferation of the progenitor cell induced by the contact.

10 <Marker Polynucleotide Probes>

The dopaminergic neuron proliferative progenitor cell marker polynucleotide probes of the present invention are used as markers that select and/or detect dopaminergic neuron progenitor cells. Polynucleotides used for this probe comprise a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2 encoding Lrp4 polypeptide expressed in dopaminergic neuron progenitor cells prior to cell cycle exit. SEQ ID NO: 1 is the nucleotide sequence of murine Lrp4 cDNA, SEQ ID NO: 2 is the nucleotide sequence of human Lrp4 cDNA, and both sequences have been registered in GenBank (murine: Accession No. NM_016869; human: Accession No. XM_035037).

Here, a "marker polynucleotide probe" refers to a polymer composed of a number of nucleotides, such as deoxyribonucleic acids (DNAs) or ribonucleic acids (RNAs), or nucleotide pairs, that should be able to detect expression of Lrp4, particularly transcribed mRNA. Double-stranded cDNA is also known to be able to be used as a probe in tissue *in situ* hybridization, and such double-stranded cDNA is included in the marker of the present invention. RNA probes (riboprobes) are particularly preferable as marker polynucleotide probes for detecting RNA in tissue. If needed, the marker polynucleotide probes of the present invention can also contain non-naturally-occurring nucleotides such as 4-acetylcytidine, 5-(carboxyhydroxymethyl)uridine, 2'-O-methylcytidine, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluridine, dihydrouridine, 2'-O-methylpseudouridine, β -D-galactosylqueuosine, 2'-O-methylguanosine, inosine, N6-isopentenyladenosine, 1-methyladenosine, 1-methylpseudouridine, 1-methylguanosine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanosine, 2-methyladenosine, 2-methylguanosine, 3-methylcytidine, 5-methylcytidine, N6-methyladenosine, 7-methylguanosine, 5-methylaminomethyluridine, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouridine, β -D-mannosylqueuosine, 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine, 5-methoxycarbonylmethyluridine, 5-methoxyuridine, 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine, N-((9- β -D-ribofuranosyl-2-methylthiopurin-6-yl)carbamoyl)threonine, N-((9- β -D-ribofuranosylpurin-6-yl)N-methylcarbamoyl)threonine, uridine-5-oxyacetic acid-

methyl ester, uridine-5-oxyacetic acid, wybutoxosine, pseudouridine, queuosine, 2-thiocytidine, 5-methyl-2-thiouridine, 2-thiouridine, 4-thiouridine, 5-methyluridine, N-((9- β -D-ribofuranosylpurin-6-yl)carbamoyl)threonine, 2'-O-methyl-5-methyluridine, 2'-O-methyluridine, wybutosine, and 3-(3-amino-3-carboxy propyl)uridine.

5 Moreover, a marker polynucleotide probe of the present invention comprises a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4 that encodes Lrp4 polypeptide specifically expressed in dopaminergic neuron progenitor cells prior to cell cycle exit. The nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4 includes not only nucleotide sequences of SEQ ID NO: 1 or
10 2, but also nucleotide sequences that differ from the sequence of SEQ ID NO: 1 or 2 due to degeneracy of the genetic code. The marker polynucleotide probes of the present invention also include those which comprise a sequence complementary to the nucleotide sequence encoding a sequence that lacks a transmembrane domain in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4. There is no signal sequence in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4. In murine Lrp4
15 (SEQ ID NO: 3), amino acid residues 113-135 form a transmembrane domain, while in human Lrp4 (SEQ ID NO: 4), amino acid residues 46-68 form a transmembrane domain. Furthermore, the sequences described in SEQ ID NOs: 3 and 4 are respectively registered in GenBank.

 Herein, the phrase "complementary to a nucleotide sequence" encompasses not only cases wherein a nucleotide sequence completely pairs with the template, but also includes those
20 that have at least 70%, preferably 80%, more preferably 90%, and even more preferably 95% or more (for example, 97% or 99%) of the nucleotides paired with the template. To pair refers to the formation of a chain, in which T (U in the case of an RNA) corresponds to A, A corresponds to T or U, G corresponds to C, and C corresponds to G in the nucleotide sequence of the template polynucleotide. Homologies at the nucleotide sequence level between certain polynucleotides
25 can be determined by the BLAST algorithm (Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7). The BLASTN program for nucleotide sequences (Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410) has been developed based on this algorithm, and can be used to determine the homology of marker polynucleotide probe sequences (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> for a specific example of
30 analysis methods).

 Moreover, a marker polynucleotide probe of the present invention includes a polynucleotide that contains a sequence that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide comprised of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2 that encodes Lrp4 polypeptide specifically expressed in dopaminergic neuron progenitor cells prior to cell cycle
35 exit. Although polynucleotides that have a nucleotide sequence indicated in SEQ ID NO: 1 or 2 are known with respect to Lrp4, their alternative isoforms and allelic variants may also exist.

Polynucleotides having a sequence complementary to such isoforms and allelic variants can also be used as a marker polypeptide of the present invention. Such isoforms and allelic variants can be obtained from cDNA libraries or genomic libraries derived from animals such as humans, mice, rats, rabbits, hamsters, chickens, pigs, cows, goats, and sheep, by using a polynucleotide probe comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, in known hybridization methods, such as colony hybridization, plaque hybridization, or Southern blotting. See "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed." (Cold Spring Harbor Press (1989)) for methods of cDNA library construction. In addition, a commercially available cDNA library or genomic library may also be used.

More specifically, in constructing a cDNA library, total RNA is first prepared from cells, organs, tissues, or such that express Lrp4, by known techniques, such as guanidine ultracentrifugation (Chirwin *et al.* (1979) *Biochemistry* 18: 5294-5299) or AGPC (Chomczynski and Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156-159), followed by purification of mRNA using the mRNA Purification Kit (Pharmacia), or such. A kit for direct mRNA preparation, such as the QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia), may also be used. Next, cDNA is synthesized from the resulting mRNA using reverse transcriptase. cDNA synthesis kits, such as the AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Seikagaku Corporation), are also commercially available. Other methods that use the 5'-RACE method to synthesize and amplify cDNA by PCR may also be used (Frohman *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002; Belyavsky *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 2919-32). In addition, in order to construct cDNA libraries containing a high percentage of full-length clones, known techniques such as the oligo-capping method (Maruyama and Sugano (1994) *Gene* 138: 171-4; Suzuki (1997) *Gene* 200: 149-56) can also be employed. The cDNA obtained in this manner is then incorporated into a suitable vector.

Examples of hybridization conditions suitable for use in the present invention include "2x SSC, 0.1% SDS, 50°C", "2x SSC, 0.1% SDS, 42°C" and "1x SSC, 0.1% SDS, 37°C". Examples of conditions of higher stringency include "2x SSC, 0.1% SDS, 65°C", "0.5x SSC, 0.1% SDS, 42°C" and "0.2x SSC, 0.1% SDS, 65°C". More specifically, a method that uses the Rapid-hyb buffer (Amersham Life Science) can be carried out by performing pre-hybridization at 68°C for 30 minutes or more, adding a probe to allow hybrid formation at 68°C for 1 hour or more, washing three times in 2x SSC/0.1% SDS at room temperature for 20 minutes each, washing three times in 1x SSC/0.1% SDS at 37°C for 20 minutes each, and finally washing twice in 1x SSC/0.1% SDS at 50°C for 20 minutes each. This can also be carried out using, for example, the Expresshyb Hybridization Solution (CLONTECH), by performing pre-hybridization at 55°C for 30 minutes or more, adding a labeled probe and incubating at 37°C to 55°C for 1 hour or more, washing three times in 2x SSC/ 0.1% SDS at room temperature for 20

minutes each, and washing once at 37°C for 20 minutes with 1x SSC/0.1% SDS. Herein, conditions of higher stringency can be achieved by increasing the temperature for pre-hybridization, hybridization, or second wash. For example, a pre-hybridization and hybridization temperature of 60°C can be raised to 68°C for higher stringency. In addition to factors such as salt concentration of the buffer and temperature, a person with ordinary skill in the art can also integrate other factors, such as probe concentration, probe length, and reaction time, to obtain Lrp4 isoforms and allelic variants, and corresponding genes derived from other organisms.

References such as Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. (Cold Spring Harbor Press (1989); Section 9.47-9.58), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons (1987-1997); Section 6.3-6.4), DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed. (Oxford University (1995); Section 2.10 for conditions, in particular), can be referred to for detailed information on hybridization procedures. Examples of hybridizing polynucleotides include polynucleotides containing a nucleotide sequence that has at least 50% or more, preferably 70%, more preferably 80% and even more preferably 90% (for example, 95% or more, or 99%) identity with a nucleotide sequence comprising the nucleotides of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2. Such identities can be determined by the BLAST algorithm (Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7) as described in the homology determination above. In addition to the above-described BLASTN program for nucleotide sequences, the BLASTX program for determining the identity of amino acid sequences (Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10) and the like have been developed based on this algorithm and can be used (as described above, see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> for a specific example of analysis methods).

Lrp4 isoforms or allelic variants, and other genes with an Lrp4-like structure or function, can be obtained from cDNA libraries and genomic libraries of animals such as humans, mice, rats, rabbits, hamsters, chickens, pigs, cows, goats, and sheep, by designing primers based on the nucleotide sequences of SEQ ID NOs: 1 and 2, using gene amplification technology (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Sections 6.1-6.4).

The polynucleotide sequences can be confirmed by using conventional sequence determination methods. For example, the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger *et al.* (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) can be used. In addition, sequences can also be analyzed using a suitable DNA sequencer.

Moreover, a marker polynucleotide probe of the present invention includes the aforementioned (1) sequence complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2, (2) sequence complementary to a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence described in SEQ ID NO: 3 or 4, (3) sequence complementary to a nucleotide sequence that

encodes a sequence lacking the transmembrane domain portion of the amino acid sequence described in SEQ ID NO: 3 or 4, and (4) polynucleotide comprising a nucleotide sequence that contains at least 15 consecutive nucleotides in each of the nucleotide sequences that hybridize under stringent conditions with a polynucleotide comprised of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2.

Such a polynucleotide comprising a nucleotide sequence that contains at least 15 consecutive nucleotides can be used as a probe for detecting, or as a primer for amplifying, the expression of Lrp4 mRNA. The nucleotide chain normally consists of 15 to 100, and preferably 15 to 35 nucleotides when used as a probe, or at least 15 and preferably 30 nucleotides when used as a primer. A primer can be designed to have a restriction enzyme recognition sequence, a tag or such, added to the 5'-end side thereof, and at the 3' end, a sequence complementary to a target sequence. Such a polynucleotide, comprising a nucleotide sequence that contains at least 15 consecutive nucleotides, can hybridize with an Lrp4 polynucleotide.

A marker polynucleotide probe of the present invention can be prepared by the aforementioned hybridization or PCR or such from cells that express Lrp4. In addition, a marker polynucleotide probe of the present invention can also be produced by chemical synthesis based on known Lrp4 sequence data. Riboprobes, which are considered to be particularly preferable for detecting RNA in tissue, can be obtained by, for example, inserting a cloned Lrp4 gene or portion thereof into plasmid vector pSP64 in the reverse direction followed by run-off transcription of the inserted sequence portion. Although pSP64 contains an SP6 promoter, methods for producing riboprobes by combining phage T3, T7 promoter and RNA polymerase are also known.

25 <Antibodies>

The present invention also provides antibodies that can be used to select dopaminergic neuron progenitor cells from brain tissue or cultured cells. Antibodies of the present invention include polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, single-chain antibodies (scFV) (Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol. 113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp. 269-315), humanized antibodies, multispecific antibodies (LeDoussal *et al.* (1992) *Int. J. Cancer Suppl.* 7: 58-62; Paulus (1985) *Behring Inst. Mitt.* 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537-9; Zimmermann (1986) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 105: 176-260; Van Dijk *et al.* (1989) *Int. J. Cancer* 43: 944-9), and antibody fragments such as Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, and Fv. Moreover, an antibody of the present invention may also be modified by PEG and such, as necessary. An antibody of the present invention may also be produced in the

form of a fusion protein with β -galactosidase, maltose-binding protein, GST, green fluorescent protein (GFP) and such, to allow detection without the use of a secondary antibody. In addition, an antibody may be modified by labeling with biotin or such, to allow recovery using avidin, streptoavidin, or such.

5 The antibodies of present invention are specific to any of (1) a polypeptide encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2, (2) a polypeptide comprised of the amino acid sequence described in SEQ ID NO: 3 or 4, (3) a polypeptide comprised of an amino acid sequence lacking a transmembrane domain in the amino acid sequence described in SEQ ID NO: 3 or 4, (4) a polypeptide comprised of an amino acid sequence wherein one or more amino acids
10 in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4 are deleted, inserted, substituted, or added, (5) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions with a sequence complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2, and (6) a polypeptide that is a fragment of a polypeptide of (1) to (5) above that has at least eight amino acid residues.

15 An antibody of the present invention can be produced using as a sensitizing antigen an Lrp4 polypeptide, or a fragment thereof, or cells that express Lrp4 polypeptide or Lrp4 polypeptide fragment. In addition, a short fragment of Lrp4 polypeptide may also be used as an immunogen by coupling to a carrier such as bovine serum albumin, Keyhole-limpet hemocyanin, and ovalbumin. In addition, the Lrp4 polypeptide, or a fragment thereof, may be used in
20 combination with a known adjuvant, such as aluminum adjuvant, Freund's complete (or incomplete) adjuvant, or pertussis adjuvant, to enhance the immune response to the antigen.

 The "Lrp4 polypeptide" in the present invention is a peptide polymer, a preferred example of which is a protein having the amino acid sequence described in SEQ ID NO: 3 or 4. The amino acid residues that compose an Lrp4 polypeptide may be naturally occurring or
25 modified ones. Moreover, the Lrp4 polypeptides include proteins lacking a transmembrane domain portion, and fusion proteins modified by other peptide sequences.

 In the present invention, the Lrp4 polypeptide should have the antigenicity of an Lrp4 polypeptide, and includes a polypeptide having an amino acid sequence wherein one or more amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4 are deleted, inserted, substituted,
30 or added. It is well known that mutant polypeptides comprising an amino acid sequence in which one or more amino acids are deleted, inserted, substituted, or added, maintain the same biological activity as the original polypeptide (Mark *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang *et al.* (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland *et al.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13). Such
35 a polypeptide that maintains the antigenicity of Lrp4 and having an amino acid sequence in which one or more amino acids are deleted, inserted, substituted, or added to the amino acid

sequence of SEQ ID NO: 3 or 4, can be obtained by preparing a polynucleotide that encodes the polypeptide according to known methods such as site-directed mutagenesis described in "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed." (Cold Spring Harbor Press (1989)), "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons (1987-1997); especially section 8.1-8.5), Hashimoto-Goto *et al.* (1995) Gene 152: 271-5, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92, Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67, Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6), and others, and then suitably expressing.

An Lrp4 polypeptide fragment is identical to a portion of the aforementioned Lrp4 polypeptide, and consists of at least eight amino acid residues or more (for example, 8, 10, 12, or 15 amino acid residues or more). A particularly preferred fragment can be exemplified by a polypeptide fragment lacking an amino terminus, carboxyl terminus, and transmembrane domain. The Lrp4 polypeptide fragments include fragments containing an α -helix and α -helix forming region, α -amphipathic region, β -sheet and β -sheet forming region, β -amphipathic region, substrate binding region, high antigen index region, coil and coil forming region, hydrophilic region, hydrophobic region, turn and turn forming region, and surface forming region. In the context of the present invention, an Lrp4 polypeptide fragment may be any fragment, so long as it has the antigenicity of an Lrp4 polypeptide. The antigen-determining site of a polypeptide can be predicted by using methods for analyzing hydrophobicity/hydrophilicity of an amino acid sequence of a protein (Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22), or methods of secondary structure analysis (Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 251-76), and can be confirmed using a computer program (Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985)), or the PEPSCAN method in which a short peptide is synthesized followed by confirmation of its antigenicity (Published Japanese Translation of International Publication No. Sho 60-500684), or the like.

Lrp4 polypeptides and Lrp4 polypeptide fragments can be isolated from Lrp4-expressing cells, tissues, etc., based on their physical properties and such. In addition, these polypeptides and polypeptide fragments can also be produced using known genetic recombination techniques or chemical synthesis methods. For example, for *in vitro* Lrp4 polypeptide production, Lrp4 polypeptides can be produced in an *in vitro* cell-free system using methods such as *in vitro* translation (Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44). In contrast, when producing polypeptides using cells, a polynucleotide that encodes a polypeptide of interest is first incorporated into an appropriate vector, a suitable cell host is selected, and then the cells are transformed by the vector. Subsequently, the transformed cells can be cultured to obtain a polypeptide of interest.

Appropriate vectors include various vectors, such as plasmids, cosmids, viruses, bacteriophages, cloning vectors, and expression vectors (Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John

Wiley & Sons (1987)). Vectors comprise regulatory sequences for the expression of a desired polynucleotide in transfected host cells, and the polynucleotide is incorporated therein so that it will be under the control of the regulatory sequences. Here, the phrase "regulatory sequence" includes promoters, ribosome binding sites, and terminators in the case of a prokaryotic host cell, and promoters and terminators in the case of a eukaryotic host cell, and in some cases, may also contain transactivators, transcription factors, poly A signals which stabilize transcription products, splicing and polyadenylation signals, and others. Such a regulatory sequence comprises all the components required for the expression of a polynucleotide linked thereto. A vector may further comprise a selection marker. Moreover, a signal peptide required for transferring an intracellularly expressed polypeptide into the lumen of the endoplasmic reticulum, or the periplasm or extracellular space when the host is a Gram negative microbe, can also be incorporated into an expression vector by linking to a polypeptide of interest. Such a signal peptide can be a signal peptide derived from a heterologous protein. Moreover, a linker may be added, and a start (ATG) or stop codon (TAA, TAG, or TGA) may be inserted as necessary.

Examples of vectors capable of expressing polypeptides *in vitro* include pBEST (Promega). In addition, various vectors are known to be suitable for expression in prokaryotic hosts (see, e.g., "Basic Microbiology Course 8 - Genetic Engineering" (Kyoritsu Publishing)). When selecting prokaryotic cells as the host, a person with ordinary skill in the art can suitably select a vector suitable for the host and a suitable method for introducing the vector into the host. Other examples of hosts that can be used to express Lrp4 polypeptides and their antigenic fragments include fungal cells such as yeasts, higher plants, insects, fish, amphibians, reptiles, birds, mammals, cultured cells (COS, Hela, C127, 3T3, BHK, HEK293, Bowes melanoma cells), myeloma, Vero, Namalwa, Namalwa KJM-1, and HBT5637 (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Sho 63-299). Vector systems suitable for each cell and methods for introducing a vector into host cells are also known. Moreover, methods for expressing exogenous proteins in animals *in vivo* (see, e.g., Susumu (1985) Nature 315: 592-4; Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54) and in plant bodies are also known, and can be used to express Lrp4 polynucleotides.

Insertion of a DNA into a vector can be carried in a ligase reaction using restriction enzyme sites (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63). In addition, an Lrp4 polypeptide-encoding expression vector can be designed as necessary by selecting a nucleotide sequence that has a high expression efficiency in view of the host's codon usage frequency (Grantham *et al.* (1981) Nucleic Acids Res. 9: r43-74). A host that produces an Lrp4 polypeptide comprises in its cells a polynucleotide that encodes an

Lrp4 polypeptide. So long as the polynucleotide does not exist at a naturally occurring position in the genome of a host cell, the polynucleotide itself may be regulated by its own promoter, incorporated in the host genome, or maintained as an extrachromosomal structure.

Culturing of host cells is carried out using known methods that are appropriate for the host cell selected. For example, when animal cells are selected, culturing can be carried out at a pH of about 6 to 8 and a temperature of 30°C to 40°C for about 15 to 200 hours, using a medium such as DMEM (Virology 8: 396 (1959)), MEM (Science 122: 501 (1952)), RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967)), 199 (Proc. Soc. Biol. Med. 73: 1 (1950)), or IMDM, and adding serum such as fetal calf serum (FCS), as necessary. In addition, the medium may be replaced, aerated, or stirred, during the course of culturing, as necessary.

Normally, an Lrp4 polypeptide produced by gene recombination techniques can be recovered from the medium if the polypeptide is secreted outside of a cell, or from the body fluid of a transgenic organism. When a polypeptide is produced inside of a cell, the cells are dissolved and the polypeptide is recovered from the dissolved product. The polypeptide of interest is then purified by suitably combining known methods of protein purification, such as salting out, distillation, various types of chromatography, gel electrophoresis, gel filtration, ultrafiltration, recrystallization, acid extraction, dialysis, immunoprecipitation, solvent precipitation, solvent extraction, and ammonium sulfate or ethanol precipitation. Examples of chromatographies include ion exchange chromatography, such as anion or cation exchange chromatography, affinity chromatography, reversed-phase chromatography, adsorption chromatography, gel filtration chromatography, hydrophobic chromatography, hydroxyapatite chromatography, phosphocellulose chromatography, and lectin chromatography (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak *et al.* ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Chromatography can be carried out using a liquid phase chromatography, such as HPLC or FPLC. In addition, for example, a protein fused with GST can be purified by glutathione column, and a protein with histidine tag can be purified by nickel column. When an Lrp4 polypeptide is produced as a fusion protein, unnecessary portions can be removed using thrombin, factor Xa, or the like, following purification as necessary.

In addition, naturally-occurring polypeptides can also be purified and obtained. For example, polypeptides can be purified by affinity chromatography using antibodies against the Lrp4 polypeptides (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19). Moreover, the purified polypeptide can also be modified using enzymes, such as chymotrypsin, glucosidase, trypsin, protein kinase, and lysyl endopeptidase, as necessary. In addition to the aforementioned synthesis and genetic engineering techniques as used for an Lrp4 polypeptide, an Lrp4 polypeptide fragment can also be produced by cleaving an Lrp4

polypeptide, using suitable enzymes, such as peptidase.

Polyclonal antibodies for selecting dopaminergic neuron proliferative progenitor cells can be obtained from, for example, the serum of an immunized animal after immunizing a mammal with an Lrp4 polypeptide purified as described above, or a fragment thereof, coupled to a desired adjuvant. Although there are no particular limitations on the mammals used, typical examples include rodents, lagomorphs, and primates. Specific examples include rodents such as mice, rats, and hamsters, lagomorphs such as rabbits, and primates such as monkeys, including cynomolgus monkeys, rhesus monkeys, baboons, and chimpanzees. Animal immunization is carried out by suitably diluting and suspending a sensitizing antigen in phosphate-buffered saline (PBS) or physiological saline, mixing with an adjuvant as necessary until emulsified, and injecting into an animal intraperitoneally or subcutaneously. The sensitizing antigen mixed with Freund's incomplete adjuvant is preferably administered several times, every 4 to 21 days. Antibody production can be confirmed by measuring the level of an antibody of interest in the serum using conventional methods. Finally, the serum itself may be used as a polyclonal antibody, or it may be further purified. See, for example, "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons (1987) Sections 11.12-11.13), for specific methods.

A monoclonal antibody can be produced by removing the spleen from an animal immunized in the manner described above, separating immunocytes from the spleen, and fusing with a suitable myeloma cell using polyethylene glycol (PEG) or such to establish hybridomas. Cell fusion can be carried out according to the Milstein method (Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46). Here, suitable myeloma cells are exemplified particularly by cells that allow chemical selection of fused cells. When using such myeloma cells, fused hybridomas are selected by culturing in a culture medium (HAT culture medium) that contains hypoxanthine, aminopterin, and thymidine, which destroy cells other than the fused cells. Next, a clone that produces an antibody against a polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, is selected from the established hybridomas. Subsequently, the selected clone is introduced into the abdominal cavity of a mouse or such, and ascites is collected to obtain a monoclonal antibody. See, in addition, "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11), for information on specific methods.

Hybridomas can also be obtained by first sensitizing human lymphocytes that have been infected by EB virus with an immunogen *in vitro*, and fusing the sensitized lymphocytes with human myeloma cells (such as U266) to obtain hybridomas that produce human antibodies (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Sho 63-17688). In addition, human antibodies can also be obtained by using antibody-producing cells generated by sensitizing a transgenic animal with a human antibody gene repertoire (WO92/03918; WO93-02227;

WO94/02602; WO94/25585; WO96/33735; WO96/34096; Mendez *et al.* (1997) Nat. Genet. 15: 146-156, etc.). Methods that do not use hybridomas can be exemplified by a method in which a cancer gene is introduced to immortalize immunocytes such as antibody producing lymphocytes.

- In addition, antibodies can also be produced by genetic recombination techniques (see
- 5 Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers Ltd., UK). First, a gene that encodes an antibody is cloned from hybridomas or antibody-producing cells (such as sensitized lymphocytes). The resulting gene is then inserted into a suitable vector, the vector is introduced into a host, and the host is then cultured to produce the antibody. This type of recombinant antibody is also included in the antibodies of the present invention.
- 10 Typical examples of recombinant antibodies include chimeric antibodies, comprising a non-human antibody-derived variable region and a human antibody-derived constant region, and humanized antibodies, comprising a non-human-derived antibody complementarity determining region (CDR), human antibody-derived framework region (FR), and human antibody constant region (Jones *et al.* (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann *et al.* (1988) Nature 332: 323-9; Presta
- 15 (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991)).

- Antibody fragments can be produced by treating the aforementioned polyclonal or monoclonal antibodies with enzymes such as papain or pepsin. Alternatively, an antibody fragment can be produced by genetic engineering techniques using a gene that encodes an antibody fragment (see Co *et al.*, (1994) J. Immunol. 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989)
- 20 Methods Enzymol. 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol. 121: 652-63; Rousseaux *et al.* (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) Trends Biotechnol. 9: 132-7).

- Multispecific antibodies include bispecific antibodies (BsAb), diabodies (Db), and such. Multispecific antibodies can be produced by methods such as (1) chemically coupling antibodies
- 25 having different specificities with different types of bifunctional linkers (Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32), (2) fusing hybridomas that secrete different monoclonal antibodies (Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9), or (3) transfecting eukaryotic cell expression systems, such as mouse myeloma cells, with a light chain gene and a heavy chain gene of different monoclonal antibodies (four types of DNA), followed by the isolation of a bispecific
- 30 monovalent portion (Zimmermann (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk *et al.* (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9). On the other hand, diabodies are dimer antibody fragments comprising two bivalent polypeptide chains that can be constructed by gene fusion. These can be produced using known methods (see Holliger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; WO93/11161).

- 35 Recovery and purification of antibodies and antibody fragments can be carried out using Protein A and Protein G, or according to the protein purification techniques as described above in

producing nonantibody polypeptides (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). For example, when using Protein A to purify an antibody of the present invention, known Protein A columns such as Hyper D, POROS, or Sepharose F.F. (Pharmacia) can be used. The concentration of the resulting antibody can be

5 determined by measuring the absorbance or by enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA).

Antigen binding activity of an antibody can be determined by absorbance measurement, or by using fluorescent antibody methods, enzyme immunoassay (EIA) methods, radioimmunoassay (RIA) methods, or ELISA. When ELISA is used, an antibody of the present invention is first immobilized onto a support, such as a plate. An Lrp4 polypeptide is added,

10 and then a sample containing the antibody of interest is added. Herein, samples containing an antibody of interest include, for example, culture supernatants of antibody-producing cells, purified antibodies, and such. Next, a secondary antibody that recognizes an antibody of the present invention is added, followed by the incubation of the plate. Subsequently, the plate is washed and the label attached to the secondary antibody is detected. Namely, if a secondary

15 antibody is labeled with alkaline phosphatase, the antigen binding activity can be determined by adding an enzyme substrate such as p-nitrophenyl phosphate, and measuring the absorbance. In addition, a commercially available system such as BIAcore (Pharmacia) can also be used to evaluate antibody activities.

20 <Selection of Dopaminergic Neurons>

The present invention provides a method of selectively obtaining homogeneous populations of dopaminergic neuron proliferative progenitor cells prior to cell cycle exit. Dopaminergic neuron progenitor cells prior to cell cycle exit can be selected using a marker polynucleotide probe or antibody of the present invention. Here, the term "selected" includes

25 both the detection of the presence of dopaminergic neuron proliferative progenitor cells in a sample, and the subsequent separation or isolation of those progenitor cells following the detection of their presence. More specifically, the present invention provides a method of selecting dopaminergic neuron progenitor cells, comprising a step of contacting a marker polynucleotide probe of the present invention with a cell sample containing potential

30 dopaminergic neuron proliferative progenitor cells. In this method, the marker polynucleotide probe is preferably labeled with a radioactive isotope or non-radioactive compound. Examples of radioactive isotopes used for labeling include ^{35}S and ^3H . When using a radiolabeled marker polynucleotide probe, RNA that binds with the marker can be detected by detecting silver particles using emulsion autoradiography. In addition, examples of non-radioactive isotopes for

35 labeling a marker polynucleotide probe include biotin and digoxigenin. A biotin-labeled marker can be detected using, for example, avidin labeled with fluorescence or an enzyme such

as alkaline phosphatase or horseradish peroxidase. On the other hand, anti-digoxigenin antibodies labeled with fluorescence or an enzyme, such as alkaline phosphatase or horseradish peroxidase, can be used to detect a digoxigenin-labeled marker. When using enzyme labeling, detection is carried out by incubating with the enzyme substrate to form a stable pigment at the location of the marker. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is convenient and particularly preferable.

In addition, the present invention provides a method of selecting dopaminergic neurons comprising a step of contacting an antibody for selecting dopaminergic neuron proliferative progenitor cells of the present invention with a cell sample containing potential dopaminergic neuron proliferative progenitor cells. Namely, cells expressing Lrp4 polypeptide, or in other words, dopaminergic neuron proliferative progenitor cells prior to cell cycle exit, can be acquired by contacting a cell sample containing potential dopaminergic neuron proliferative progenitor cells with an antibody of the present invention, and selecting those cells that have bound to the antibody (see Fig. 6). The antibody may also be immobilized on a suitable support, prior to cellular contact. Alternatively, cells that bind with the antibody can be selectively recovered, by contacting cells with an antibody and allowing them to bind, and purifying the antibody by affinity chromatography. For example, if an antibody of the present invention is conjugated to biotin, it can be purified on a plate or column bound with avidin or streptoavidin. In addition, magnetic particles can be bound to an antibody, for example, and the antibody and cells that express on their surfaces Lrp4 bound to the antibody, can be recovered using a magnet. Dopaminergic neurons that express Lrp4 can be selected by flow cytometry using a cell sorter and fluorescent-labeled anti-Lrp4 antibodies and such.

Moreover, the present invention can provide dopaminergic neuron progenitor cells which have a lower risk of tumorigenesis and therefore particularly suitable for transplantation therapy, by screening the cultured progenitor cells using a postmitotic neuron marker after culturing dopaminergic neuron proliferative progenitor cells selected using a marker polynucleotide probe or antibody of the present invention. An example of postmitotic neuron markers is 65B13. For example, dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit can be selected by contacting antibodies to 65B13 polypeptide with cultured dopaminergic neuron progenitor cells, and selecting those cells that express 65B13 polypeptide. In addition, 65B13 has an Ig domain adhesion molecule-like structure. When 65B13 has been expressed in cultured cells, although cells that have expressed 65B13 adhere together, they do not adhere to cells that do not express 65B13. Consequently, adhesion mediated by 65B13 is considered to involve homophilic binding. Therefore, 65B13-expressing dopaminergic neuron precursor cells can also be screened using the adhesion of the extracellular domain of 65B13 polypeptide.

In addition, Lrp4-expressing dopaminergic neuron proliferative progenitor cells and 65B13-expressing dopaminergic neuron precursor cells can also be selected and/or screened using promoters for Lrp4 and 65B13, respectively (see, for example, Unexamined Published Japanese Patent Application No. 2002-51775). For example, a vector harboring a construct that
 5 comprises a gene encoding a detection marker, such as GFP, linked to a promoter region obtained from analyzing the Lrp4 expression regions to be described later, can be transfected into cells. In addition, a gene encoding a marker can also be knocked in at the Lrp4 gene locus. In either case, specific cells can be selected by detecting the expression of a marker gene specific for dopaminergic neuron progenitor cells. With respect to 65B13, screening can also be
 10 performed in a similar manner to Lrp4. For example, the sequence disclosed in Japanese Patent Application No. 2002-307573 can be referred to for 65B13.

The cell sample used herein preferably comprises cells of the ventral midbrain region or culture medium containing *in vitro* differentiated dopaminergic neurons. *In vitro* differentiation of dopaminergic neurons can be carried out by known methods using cells, such as known ES
 15 cells, bone marrow interstitial cells, immortalized neuron-derived cell lines (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 8-509215; Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-506930; Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-522070), or primordial neuron cells (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-509729), as the starting material. Normally, dopaminergic
 20 neurons can be differentiated by co-culturing a tissue obtained from a dopaminergic neuron region of the brain, with a sustentacular cell layer derived from neural tissues. Moreover, methods are also known for deriving dopaminergic cells from neural tissues that normally do not produce dopamine, such as the striatum and cortex (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-509319). In addition, culturing under hypoxic conditions
 25 has been reported to produce cells containing a greater number of dopaminergic neurons (Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-530068). A cell sample used in the selection of dopaminergic neuron progenitor cells of the present invention may be a cell population isolated or cultured by any method including the above-described methods.

In addition, it is necessary that a support used in immobilizing an antibody or a
 30 polypeptide of the present invention be safe to cells. Examples of such supports include synthetic or naturally-occurring organic polymer compounds, inorganic materials such as glass beads, silica gel, alumina, and activated charcoal, and those that have their surfaces coated with a polysaccharide or synthetic polymer. There are no particular limitations on the form of the support, examples of which include films, fibers, granules, hollow fibers, non-woven fabric,
 35 porous supports, or honeycombed supports, and the contact surface area can be controlled by changing its thickness, surface area, width, length, shape, and size in various ways.

<Dopaminergic Neuron Progenitor Cells>

Since cells acquired by using the expression of Lrp4 as an index are dopaminergic neuron proliferative progenitor cells prior to cell cycle exit, they are preferable in transplantation therapy for neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, in terms of their safety, survival rate, and network formation ability, as compared to conventional mixed cell populations or dopaminergic neurons carrying an exogenous gene. Cells acquired by using expression of Lrp4 as an index can be used in transplanting directly or after growing *in vitro* (Fig. 6). Since dopaminergic neuron progenitor cells of the present invention that have been selected by using expression of Lrp4 as an index are proliferative progenitor cells, they are able to differentiate and mature at optimal locations in the brain, and can further proliferate *in vivo*, thereby resulting in expectations of long-term therapeutic effects. Moreover, since cells (populations) of the present invention obtained according to the method of the present invention are progenitor cells prior to cell cycle exit, they can also be differentiated into a suitable stage by selecting *in vitro* conditions, such as media, and are preferred materials for various types of neural transplantation therapy. For example, cells having a higher degree of safety in terms of transplanting can be obtained from the cells selected by using expression of Lrp4 as an index as described above, by additionally selecting using a postmitotic marker (for example, 65B13) as an index.

When neuron progenitor cells obtained using the methods of the present invention are used in transplants, preferably 1×10^3 to 1×10^6 neurons, and more preferably 5×10^4 to 6×10^4 neurons, are transplanted. The primary method is stereotaxic surgery in which a cell suspension is transplanted into the brain. In addition, cells may also be transplanted by microsurgery. See, Backlund *et al.* (Backlund *et al.* (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73), Lindvall *et al.* (Lindvall *et al.* (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68), or Madrazo *et al.* (Madrazo *et al.* (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4), for methods of transplanting neuron tissues.

Moreover, the cells of the present invention can also be used to isolate genes specific to dopaminergic neuron progenitor cells, and genes specific to each stage of the maturation from progenitor cells into dopaminergic neurons. They can also be used to search for therapeutic targets for Parkinson's disease, elucidate the maturation process of dopaminergic neurons, and in screenings using maturation as an indicator.

<Comparison of Gene Expression Levels>

Dopaminergic neuron progenitor cells, which were obtained using an antibody of the present invention, can be used as a material to isolate genes specifically expressed in these cells. They can also be used to investigate and isolate genes specifically expressed in cells that have differentiated, induced, or proliferated from the dopaminergic neuron progenitor cells of the

present invention. In addition, they can also be used to investigate genes required for *in vivo* differentiation of dopaminergic neurons, by investigating genes that have different expression levels between cells that have differentiated, induced, or proliferated and the original progenitor cells. Since such genes are potential candidates for treating diseases caused by defects in dopaminergic neurons, their determination and isolation are extremely useful.

Comparison of gene expression levels in dopaminergic neuron progenitor cells of the present invention with those of cells that have differentiated, induced, or proliferated therefrom, or other cells; or comparison of gene expression levels of the differentiated, induced, or proliferated cells with those of other cells, can be done by commonly used methods, such as cell *in situ* hybridization, Northern blot hybridization, RNA dot blot hybridization, reverse transcription PCR, RNase protection assay, DNA microarray hybridization, serial analysis of gene expression (SAGE) (Velculescu *et al.* (1995) Science 270: 484-487), subtractive hybridization, and representation difference analysis (RDA) (Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-307).

For cellular *in situ* hybridization, locations where RNA processing, transport, and localization into the cytoplasm occur in individual cells can be investigated, by hybridizing total RNA or poly A⁺ RNA prepared from cells with a labeling probe specific to a given RNA sequence. In addition, RNA size can be determined by size fraction using gel electrophoresis. Moreover, RNA transcription products can be visualized *in situ* by using quantitative fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and a digital imaging microscope (Femino *et al.* (1998) Science 280: 585-90), which are applicable to the present invention.

When using reverse transcription PCR for gene expression analysis, the expression of a specific gene can be roughly quantified. Various isoforms of a single RNA transcription product can also be detected and analyzed using the present method. For reverse transcription PCR, when the reaction is carried out using exon-specific primers, and amplification products other than the predicted product are detected, mRNA isoforms produced by alternative splicing can be identified by analyzing these products. See, for example, the method described in Pykett *et al.* (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 559-64, for details. When a quick and rough analysis of expression pattern is demanded, the present method which uses the PCR of the present invention is particularly preferred, in terms of its high speed, high sensitivity, and simplicity.

The efficiency of gene expression screening can be improved by using a DNA chip. Here, a DNA chip refers to a miniature array, in which oligonucleotides, DNA clones, or such, are immobilized at a high density on a support surface, such as glass. For example, in order to carry out multiple expression screening, cDNA clones for each gene of interest, or oligonucleotides specific to each gene, are immobilized on a chip to produce a microarray. Next, RNAs are prepared from dopamine-specific neuron progenitor cells of the present

invention, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom, and treated with reverse transcriptase to yield cDNAs. Next, the resulting cDNA sample is labeled with fluorescent tags or other tags, and then hybridized to the microarray. As a result, genes that are actively expressed in the cells have a higher percentage of the total labeled cDNA, while genes that are not significantly expressed have a lower percentage. Namely, the fluorescent signal intensity which represents hybridization between a labeled cDNA and a cDNA clone or an oligonucleotide on the chip, reflects the expression level of each sequence in the labeled cDNA, and thereby enables the quantification of gene expression.

In addition, multiple genes in dopaminergic neuron progenitor cells of the present invention, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom, can be simultaneously analyzed by mRNA differential display, which involves reverse transcription PCR using degenerate PCR primers. First, a modified oligo dT primer is prepared, in which one or two nucleotides at the 3' terminus in the poly A tail of a given mRNA have been altered. Then, a reverse transcription reaction is carried out using the total RNAs isolated from the progenitor cells of the present invention, cells differentiated or proliferated therefrom, or control cells to be used for expression comparison (Liang *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275). If the altered nucleotide is a "G", then mRNA having a "C" immediately before the poly A tail can be selectively amplified. If the altered nucleotides are "CA", then mRNA having "TG" immediately before the poly A tail can be selectively amplified. Next, an arbitrary nucleotide sequence of about 10 nucleotides in length is prepared for use as a second primer, and a PCR amplification reaction is carried out using the modified oligo dT primer and this second primer. The amplification product is subjected to size fractionation by electrophoresis using a long polyacrylamide gel. By using such a method, cDNA derived from mRNA specifically expressed in either the cells of the present invention or the control cells can be detected as a band only present in the either sample that has been electrophoresed. This method can also be used to analyze expression of unidentified genes.

SAGE analysis does not require a special device for detection, and is one of the preferred analytical methods for simultaneously detecting the expression of a large number of transcription products. First, poly A⁺ RNA is extracted from the dopaminergic neuron progenitor cells of the present invention, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom, using standard methods. Next, the RNA is converted into cDNA using a biotinylated oligo (dT) primer, and then treated with a four-base recognizing restriction enzyme (Anchoring Enzyme: AE). Here, the AE-treated fragments contain a biotin group at their 3' terminus. Next, the AE-treated fragments are incubated with streptavidin for binding. The bound cDNA is divided into two fractions, and each fraction is then linked to a different double-stranded oligonucleotide adapter (linker) A or B. These linkers are composed of: (1) a protruding single

strand portion having a sequence complementary to the sequence of the protruding portion formed by the action of the anchoring enzyme, (2) a 5' nucleotide recognizing sequence of the IIS-type restriction enzyme (cleaves at a predetermined location no more than 20 bp away from the recognition site) serving as a tagging enzyme (TE), and (3) an additional sequence of sufficient length for constructing a PCR-specific primer. Herein, the linker-linked cDNA is cleaved using the tagging enzyme, and only the linker-linked cDNA sequence portion remains, which is present in the form of a short-strand sequence tag. Next, pools of short-strand sequence tags from the two different types of linkers are linked to each other, followed by PCR amplification using primers specific to linkers A and B. As a result, the amplification product is obtained as a mixture comprising myriad sequences of two adjacent sequence tags (ditags) bound to linkers A and B. The amplification product is treated with the anchoring enzyme, and the free ditag portions are linked into strands in a standard linkage reaction. The amplification product is then cloned. Determination of the clone's nucleotide sequence can be used to obtain a read-out of consecutive ditags of constant length. The presence of mRNA corresponding to each tag can then be identified once from the determination of the clone's nucleotide sequence and information on the sequence tags thus obtained.

Subtraction hybridization is frequently used for cloning a gene with different expression levels in various tissues or cells, and can also be used to clone a gene specifically expressed in dopaminergic neuron progenitor cells of the present invention, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom. First, from the aforementioned cells of the present invention, a DNA sample of cells to be tested is prepared (hereinafter referred to as "test DNA"). Next, DNA of cells to be compared is prepared (hereinafter referred to as "driver DNA"). The test DNA and the driver DNA can also be used interchangeably. In any case, genes present in the test DNA but not present in the driver DNA are detected. Next, the prepared test DNA is mixed with a large excess of driver DNA, and denatured to form single-stranded DNA, followed by annealing. A specific sequence not present in the driver DNA can be isolated as double-stranded DNA comprising only the test DNA sequence by regulating the annealing conditions. See, Swaroop *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1954 and Yasunaga *et al.* (1999) *Nature Genet.* 21: 363-9, for further details on this method.

The RDA method is a method that uses PCR to selectively amplify a sequence of the test DNA that is not present in the driver DNA, and can be similarly used in the present invention like the other previously described methods. See, Lisitsyn (1995) *Trends Genet.* 11: 303-7 and Schutte *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5950-4, for more details on the procedure.

Genes specific to dopaminergic neuron progenitor cells, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom, are detected and isolated as described, and can be inserted into vectors or such, for sequence determination and expression analysis using the various known methods

described above.

<Screening Using Progenitor Cell Maturation as an Index>

The present invention provides a screening method that comprises a step of contacting a
 5 test substance with dopaminergic neuron progenitor cells of the present invention, and a step of
 detecting differentiation or proliferation of the progenitor cells resulting from that contact.
 Since compounds obtained by this screening method demonstrate a regulatory function in the
 differentiation, proliferation, and such, of dopaminergic neurons, they are considered useful as
 potential therapeutic candidates for diseases caused by defects in dopaminergic neurons.

10 Here, the "test substance" may be any type of compound, examples of which include the
 expression products of gene libraries, synthetic low molecular weight compound libraries,
 synthetic peptide libraries, antibodies, substances released by bacteria, cell (microbial, plant, or
 animal) extracts, cell (microbial, plant, or animal) culture supernatants, purified or partially
 purified polypeptides, marine organisms, plant or animal extracts, soil, random phage peptide
 15 display libraries, and such.

Cell differentiation and proliferation can be detected by comparing with the status of the
 cell in the absence of the test substance. Cell differentiation and proliferation may be detected
 by morphological observation under a microscope or by detection and quantification of
 substances produced in cells, such as dopamine.

20

<Analysis of Lrp4 Expression Region>

An expression regulatory region of Lrp4 can be cloned from genomic DNA by known
 methods using a sequence of the Lrp4 gene. For example, a method for establishing the
 transcriptional start site, such as the S1 mapping method, is known and can be used (Cell
 25 Engineering, Supplement 8, New Cell Engineering Experiment Protocol, Cancer Research
 Division, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo ed., Shujunsha Publishing
 (1993) pp. 362-374). In general, the expression regulatory region of a gene can be cloned by
 screening a genomic DNA library, using a probe DNA comprising a 15-100 bp segment, and
 preferably a 30-50 bp segment, of the gene's 5' terminus (in the present invention, all or a portion
 30 of nucleotides of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2). A clone obtained in this manner contains a
 5' non-coding region of 10 kbp or more, and is shortened or fragmented by exonuclease
 treatment, or such. Finally, the shortened sequence portion, comprising a potential expression
 regulatory region, is evaluated for strength, regulation, and such, of its expression using a reporter
 gene, thereby making it possible to determine the minimum unit required for maintaining the
 35 activity of the Lrp4 expression regulatory region.

Gene expression regulatory regions can be predicted using a program such as Neural

Network (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese *et al.*, Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996)). Moreover, a program for predicting the minimum unit required for the activity of an expression regulatory region is also known,

5 (<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>; Prestidge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-932), and can be used.

The expression region of the Lrp4 gene isolated in this manner can be used to produce a protein of interest specifically in dopaminergic neuron proliferative progenitor cells prior to cell cycle exit *in vivo*.

10

<Ligand for Lrp4>

The Lrp4 polypeptides have a transmembrane domain, and thus are thought to exist embedded within the cell membrane in nature. Due of its expression in dopaminergic neuron proliferative progenitor cells before cell cycle exit, Lrp4 is believed to be involved in the
 15 regulation of progenitor cell proliferation and in neuron differentiation and maturation. Thus, potential ligands that may demonstrate an agonistic or antagonistic function towards Lrp4 may be used for regulating the differentiation of dopaminergic neurons *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*. In identifying a ligand for an Lrp4 polypeptide, the Lrp4 polypeptide and a candidate compound are first contacted and tested for the presence of binding. In this case, the Lrp4 polypeptide can
 20 be used when immobilized on a support, or embedded in the cell membrane. There are no particular limitations on the candidate compounds, examples of which include expression products of gene libraries, natural substances derived from marine organisms, extracts of various types of cells, known compounds and peptides, natural substances derived from plants, body tissue extracts, microbial culture supernatants and peptide groups randomly produced by the
 25 phage display method (J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991)). In addition, the candidate compound may be labeled for detection of binding.

<Inhibition of Lrp4 Expression>

Since it is clearly demonstrated by the present invention that Lrp4 is transiently
 30 expressed in dopaminergic neuron proliferative progenitor cells prior to cell cycle exit, Lrp4 may be involved in the control of the proliferation of progenitor cells as well as neuron differentiation and maturation. Thus, substances that inhibit the expression of the Lrp4 gene may be used to control the differentiation of dopaminergic neurons *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*. Examples of substances capable of inhibiting gene expression include antisense nucleic acids, ribozymes, and
 35 double-stranded RNA (small interfering RNA; siRNA). Thus, the present invention provides such antisense nucleic acids, ribozymes, and double-stranded RNA.

Examples of antisense mechanisms that suppress target gene expression include: (1) inhibition of transcription initiation via triplex formation, (2) transcription suppression through hybrid formation at sites of local open-loop structures formed by RNA polymerase, (3) transcription inhibition through hybrid formation with RNA during synthesis, (4) suppression of splicing through hybrid formation at intron-exon junctions, (5) suppression of splicing through hybrid formation at sites of spliceosome formation, (6) suppression of mRNA migration to the cytoplasm through hybrid formation with mRNA, (7) suppression of splicing through hybrid formation at a capping site or poly A addition site, (8) suppression of translation initiation through hybrid formation at binding sites of translation initiation factors, (9) translation suppression through hybrid formation at ribosome binding sites, (10) suppression of peptide chain elongation through hybrid formation at mRNA coding regions or polysome binding sites, and (11) suppression of gene expression through hybrid formation at sites of nucleic acid/protein interaction (Hirashima and Inoue, "New Biochemistry Experiment Course 2, Nucleic Acids IV, Gene Replication and Expression", Japanese Biochemical Society edit., Tokyo Kagaku Dozin Publishing, pp. 319-347 (1993)).

An Lrp4 antisense nucleic acid of the present invention may be a nucleic acid that inhibits gene expression by any of the mechanisms described in (1) to (11) above. Namely, it may contain an antisense sequence to not only a sequence of a coding region, but also a sequence of a non-coding region of a target gene whose expression is to be inhibited. A DNA that encodes an antisense nucleic acid can be used by linking to a suitable regulatory sequence that allows its expression. The antisense nucleic acid does not need to be completely complementary to the coding region or non-coding region of a target gene, as long as it can effectively inhibit the expression of this gene. Such antisense nucleic acids have a chain length of at least 15 bp or more, preferably 100 bp or more, and more preferably 500 bp or more, and are normally within 3000 bp, preferably within 2000 bp, and more preferably within 1000 bp. It is preferable that such antisense nucleic acids share an identity of 90% or more, and more preferably 95% or more, with the complementary chain of a target gene transcription product. These antisense nucleic acids can be prepared according to the phosphorothionate method (Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21) or the like, using an Lrp4 polynucleotide.

"Ribozyme" is a generic term referring to catalysts with an RNA component, and ribozymes are broadly classified into large ribozymes and small ribozymes. Large ribozymes cleave the phosphate-ester bonds of a nucleic acid, and after reaction, they leave 5'-phosphoric acid and 3'-hydroxyl group at the reaction sites. Large ribozymes are further classified into (1) group I intron RNAs, which carry out guanosine-initiated trans-esterification reactions at 5'-splice sites, (2) group II intron RNAs, which perform two-step self-splicing reactions via a lariat structure, and (3) RNA components of ribonuclease P, which cleave precursor tRNAs at their 5'

side via hydrolysis reactions. In contrast, small ribozymes are comparatively small structural units (about 40 bp) that cleave RNAs, forming 5'-hydroxyl groups and 2'-3' cyclic phosphoric acids. Small ribozymes include, for example, hammerhead-type ribozymes (Koizumi *et al.* (1988) FEBS Lett. 228: 225) and hairpin-type ribozymes (Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; Kikuchi (1992) Chemistry and Biology 30: 112). Since ribozymes are easily altered and synthesized, various modification methods are known. For example, hammerhead-type ribozymes that recognize and cleave nucleotide sequence UC, UU, or UA within a target RNA can be created, by designing the substrate binding portion of a ribozyme to be complementary to an RNA sequence near the target site (Koizumi *et al.* (1988) FEBS Lett. 228: 225; M. Koizumi and E. Ohtsuka (1990) Protein, Nucleic Acid and Enzyme 35: 2191; Koizumi *et al.* (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059). Hairpin-type ribozymes can also be designed and produced using known methods (Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; Kikuchi (1992) Chemistry and Biology 30: 112).

Antisense nucleic acids and ribozymes of the present invention can also be used in virus vectors derived from retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, and such, or non-virus vectors that use liposomes, or naked DNAs, to control gene expression in cells using *ex vivo* or *in vivo* gene therapy.

In 1998, a phenomenon was observed in nematodes in which RNAs interfere with each other causing them to lose function (RNA interference) (Fire *et al.* (1998) Nature 391: 806-11). RNA interference is a phenomenon in which, when an artificial double-stranded RNA is introduced into cells, RNAs having the same nucleotide sequence are degraded. As a result of subsequent research, it is suggested that RNA silencing phenomena such as RNA interference are cellular mechanisms for eliminating defective mRNA and defending the cells against transposons, viruses, and other parasites. At present, double-stranded RNAs (small interfering RNAs; siRNAs) are used as tools for suppressing the expression of numerous genes, and methods of treating and preventing diseases are being studied to suppress the expression of genes that cause diseases through the use of siRNA. There are no particular limitations on an siRNA of the present invention, provided it inhibits transcription of Lrp4 mRNA. Normally, the siRNA is a combination of a sense chain and antisense chain to the sequence of a target mRNA, and has a nucleotide length of from at least 10 to the same number of nucleotides as the target mRNA. This siRNA preferably has a nucleotide length of 15 to 75, preferably 18 to 50, and more preferably 20 to 25 nucleotides.

In order to suppress Lrp4 expression, siRNA can be introduced into a cell using known methods. For example, a DNA encoding in a single strand two RNA chains that compose an siRNA is designed and then incorporated into an expression vector, cells are transformed with the expression vector, and the siRNA can be expressed in the cells in the form of double-stranded

RNA having a hairpin structure. Plasmid expression vectors that continuously produce siRNA by transfection have also been designed (for example, RNAi-Ready pSIREN Vector, and RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (BD Biosciences Clontech)).

5 The nucleotide sequence of an siRNA can be designed using a computer program such as that disclosed at the Ambion website (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html). Kits for screening for functional siRNAs are also commercially available and can be used (for example, BD Knockout RNAi System (BD Biosciences Clontech)).

10 Brief Description of the Drawings

Fig. 1 schematically shows the structure of Lrp4. TM: transmembrane domain, FRI: frizzled domain, LDLa: LDL receptor domain, SR: scavenger receptor domain, Pro: serine protease domain.

15 Fig. 2 is a set of photographs showing the results of Lrp4 and Shh mRNA expression analysis in E12.5 mouse hindbrain ventral region and spinal cord by *in situ* hybridization.

Fig. 3 is a set of photographs showing the results of Lrp4, Shh, tyrosine hydroxylase (TH), and NCAM mRNA expression analysis in E12.5 mouse midbrain ventral region by *in situ* hybridization.

20 Fig. 4 schematically shows the expression pattern of Lrp4 in the midbrain. VZ: ventricular zone, ML: mantle layer.

Fig. 5 schematically shows the expression timings of Lrp4, 65B13, TH, NCAM, and DAT from generation to maturation of dopaminergic neurons.

Fig. 6 schematically shows the isolation methods of dopaminergic neuron proliferative progenitor cells using anti-Lrp4 antibodies and its utilization.

25 Fig. 7 is a set of photographs showing the results of Lrp4 mRNA expression analysis in E12.5 mouse central nervous system by *in situ* hybridization. A: sagittal cross-section, B: enlarged photograph of the area inside the box of A, C: cross-section at the location of the red line of A, D: Expression of Lrp4, Shh, and tyrosine hydroxylase (TH) mRNA in E12.5 mouse midbrain ventral region.

30 Fig. 8 shows the expression of Lrp4 from ES cells in an *in vitro* dopaminergic neuron differentiation system. The top of the drawing schematically shows the differentiation of dopaminergic neurons from ES cells. The bottom photograph shows the results of investigating the expression of Lrp4 in dopaminergic neurons differentiated from ES cells using the SDIA method by RT-PCR over time.

35

Best Mode for Carrying Out the Invention

The present invention will be explained in more detail with reference to examples, but should not be construed as being limited thereto.

1. Isolation and Sequence Analysis of a Gene Specific to Dopaminergic Neuron Progenitor Cells

To isolate a gene specific to dopaminergic neuron progenitor cells, the midbrain ventral region of E12.5 mice was additionally cut into two regions in the dorsoventral direction, and genes specifically expressed in the most ventral region containing dopaminergic neurons were identified by the subtraction (N-RDA) method. One of the isolated cDNA fragments was a fragment encoding Lrp4/Corin. Lrp4 encodes type II transmembrane proteins (Fig. 1).

(1) N-RDA method

10 (1)-1. Adapter preparation

The following oligonucleotides were annealed to each other, and prepared at 100 μ M.

(ad2: ad2S+ad2A, ad3: ad3S+ad3A, ad4: ad4S+ad4A, ad5: ad5S+ad5A, ad13: ad13S+ad13A)

ad2S: cagctccacaacctacatcattccgt(SEQ ID NO:5)

ad2A: acggaatgatgt(SEQ ID NO:6)

15 ad3S: gtccatcttctctctgagactctggt(SEQ ID NO:7)

ad3A: accagagtctca(SEQ ID NO:8)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtgtgt(SEQ ID NO:9)

ad4A: acacactcacag(SEQ ID NO:10)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtagcagt(SEQ ID NO:11)

20 ad5A: actgtcacactg(SEQ ID NO:12)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgtcgt(SEQ ID NO:13)

ad13A: acgatcgacagt(SEQ ID NO:14).

(1)-2. cDNA synthesis

25 Ventral midbrain regions were cut out of E12.5 mouse embryos (Japan SLC), and divided into two sections in the dorsoventral direction. Total RNA was prepared using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), and double-stranded cDNA was synthesized using a cDNA Synthesis Kit (Takara). After digestion with restriction enzyme RsaI, ad2 was added. The cDNA was amplified by a 5-minute incubation at 72°C, 15 PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 30 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C using ad2S as the primer. In all cases, N-RDA PCR was carried out using a reaction solution containing the following components.

10x ExTaq 5 μ l

2.5 mM dNTP 4 μ l

35 ExTaq 0.25 μ l

100 μ M primer 0.5 μ l

cDNA 2 μ l

Distilled water 38.25 μ l

(1)-3. Driver production

5 The ad2S amplified cDNA was further amplified by incubating at 94°C for 2 minutes, and then performing five PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C. The cDNA was purified using the Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen), and digested with RsaI. 3 μ g was used for each round of subtraction.

10

(1)-4. Tester production

The ad2S amplified cDNA was further amplified by incubating at 94°C for 2 minutes, and then performing five PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C. The cDNA was purified using the Qiaquick
15 PCR Purification Kit (Qiagen), and digested with RsaI. ad3 was added to 60 ng of the RsaI-digested cDNA.

(1)-5. First round of subtraction

The tester and the driver produced in Sections 1-3 and 1-4 above were mixed, ethanol
20 precipitated, and then dissolved in 1 μ l of 1x PCR buffer. After a 5-minute incubation at 98°C, 1 μ l of 1x PCR buffer + 1M NaCl was added. After another 5 minutes of incubation at 98°C, the tester and the driver were hybridized at 68°C for 16 hours.

With ad3S as the primer, the hybridized cDNA was amplified by incubating at 72°C for 5 minutes, and performing 10 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at
25 72°C. Next, the amplified cDNA was digested with the Mung Bean Nuclease (Takara) and purified using the Qiaquick PCR Purification Kit. Then, it was amplified by incubating at 94°C for 2 minutes, and performing 13 PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C.

30 (1)-6. Normalization

1 μ l of 2x PCR buffer was added to 8 ng of the cDNA amplified in the first round of subtraction. After incubating at 98°C for 5 minutes, 2 μ l of 1x PCR buffer + 1 M NaCl was added. After another 5 minutes of incubation at 98°C, the cDNA was hybridized at 68°C for 16 hours.

35 The hybridized cDNA was digested with RsaI, and purified using the Qiaquick PCR Purification Kit. Then, it was amplified with ad3S as the primer by incubating at 94°C for 2

minutes, and performing 11 PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C. The PCR product was then digested with RsaI, followed by the addition of ad4.

5 (1)-7. Second Round of Subtraction

20 ng of cDNA to which ad4 was added in Section 1-6 above was used as the tester and mixed with the driver of 1-3 above, and the same subtraction procedure used in Section 1-5 above was performed. Finally, ad5 was added to the cDNA following RsaI digestion.

10 (1)-8. Third Round of Subtraction

2 ng of cDNA to which ad5 was added in section 1-7 above was used as the tester and mixed with the driver of 1-3 above, and the same subtraction procedure used in section 1-5 above was carried out. Finally, ad13 was added to the RsaI-digested cDNA.

15 (1)-9. Fourth Round of Subtraction

2 ng of cDNA to which ad13 was added in section 1-8 above was used as the tester and mixed with the driver of 1-3 above, and the same subtraction procedure used in Section 1-5 above was carried out. The amplified cDNA was cloned into pCRII vector (Invitrogen), and its nucleotide sequence was analyzed using the ABI3100 sequence analyzer.

20

2. Expression Analysis of the Lrp4 Gene

Next, an expression analysis of the Lrp4 gene by *in situ* hybridization was carried out according to the following protocol.

First, E12.5 mouse embryos were embedded in O.C.T., and fresh frozen sections of 16
25 µm thickness were prepared. After drying on a slide glass, the sections were fixed in 4% PFA at room temperature for 30 minutes. After washing with PBS, hybridization was carried out at 65°C for 40 hours (1 µg/ml DIG-labeled RNA probe, 50% formamide, 5x SSC, 1% SDS, 50 µg/ml yeast RNA, 50 µg/ml Heparin). Subsequently, the sections were washed at 65°C (50% formamide, 5x SSC, 1% SDS) and then treated with RNase (5 µg/ml RNase) at room
30 temperature for 5 minutes. After washing with 0.2x SSC at 65°C and washing with 1x TBST at room temperature, blocking was carried out (Blocking reagent: Roche). The sections were then reacted with alkaline phosphatase-labeled anti-DIG antibody (DAKO), washed (1x TBST, 2 mM Levamisole), and color developed using NBT/BCIP (DAKO) as the substrate.

35 The expression analysis by *in situ* hybridization showed that Lrp4 is specifically expressed in the ventral midline region from the midbrain to the hindbrain and the spinal cord at the stage E12.5, which corresponds to the time of dopaminergic neuron development. Lrp4

demonstrates a similar expression pattern to Shh from the hindbrain to the spinal cord, and was clearly determined to be specific to the floor plate, the organizer region (Figs. 2 and 7). In the midbrain, Lrp4 expression was observed more centrally than the Shh expression zone (Figs. 3 and 7).

5 As a result of comparing with NCAM, a neuron maturation marker, Lrp4-expressing cells were proliferative progenitor cells in the NCAM-negative ventricular zone (VZ). Moreover, when compared with the expression of the dopamine neuron marker, tyrosine hydroxylase (TH), although expression of both TH and Lrp4 in the same cells was not observed since TH is only expressed in the mantle layer (ML), their expression regions completely
10 overlapped along the dorsal-ventral axis (Figs. 3 and 7). In general, neurons present in neural tubes are known to first proliferate in the VZ, exit cell cycle with the commencement of differentiation, and then mature after migrating to the outer ML. Thus, progenitor cells of dopaminergic neurons are believed to proliferate in the VZ which lines the TH expression zone, and express TH after having migrated to the outside following the cell cycle exit. Namely, Lrp4
15 is believed to be specifically expressed in the midbrain in dopaminergic neuron progenitor cells (Figs. 4 and 5).

3. Expression of Lrp4 in Dopaminergic Neurons Induced to Differentiate from ES Cells

Next, whether Lrp4 is expressed in ES cells that have been induced to differentiate into
20 dopaminergic neurons *in vitro*, was examined.

First, dopaminergic neurons were induced to differentiate from ES cells using the SDIA method (Kawasaki *et al.* (2000) Neuron 28(1): 31-40) (see the upper part of Fig. 8). Cells were recovered 4, 6, 8, 10, and 12 days after induction, and total RNA was recovered using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) followed by RT-PCR. In RT-PCR, cDNA was initially synthesized
25 for 1 µg of total RNA using the RNA PCR Kit (TaKaRa). PCR was then carried out in the following reaction system using as template cDNA equivalent to 10 ng, 1 ng, and 0.1 ng.

	10x ExTaq	2 µl
	2.5 mM dNTP	1.6 µl
	ExTaq	0.1 µl
30	100 µM primer	0.2 µl each
	cDNA	1 µl
	Distilled water	14.9 µl

After incubating for 2 minutes at 94°C, 35 PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30
seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C were carried out followed by incubating for 2 minutes at
35 72°C.

The sequences of the primers used are shown below.

Lrp4: TAGTCTACCACTGCTCGACTGTAACG/CAGAGTGAACCCAGTGGACATATCTG
 TH: GTTCCCAAGGAAAGTGTCTCAGAGTTGG/GAAGCTGGAAAGCCTCCAGGTGTTCC
 DAT: CTCCGAGCAGACACCATGACCTTAGC/AGGAGTAGGGCTTGTCTCCCAACCTG

According to the results of expression analysis by RT-PCR, although Lrp4 is not
 5 expressed in ES cells (CCE) or stroma cells (PA6), expression was clearly induced starting on
 day 4 in the same manner as TH as a result of inducing differentiation (Fig. 8). Thus, Lrp4 is
 useful as a marker not only when isolating dopaminergic neuron proliferative progenitor cells
 from fetal midbrain, but also when isolating dopaminergic neuron proliferative progenitor cells
 that have been induced to differentiate from ES cells *in vitro*.

10

Industrial Applicability

Lrp4, a gene expressed specifically and transiently in dopaminergic neuron proliferative
 progenitor cells before cell cycle exit, was identified according to the present invention. The
 cellular expression of Lrp4 can be used as an indicator in selecting suitable cells to be used in
 15 transplantation therapy for neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, in terms of
 their safety, survival rate, and network formation ability. In addition, since neural proliferative
 progenitor cells before cell cycle exit are selectively obtained, they can be easily differentiated
 into an appropriate state *in vitro* when used in therapy that requires mature cells. Moreover,
 dopaminergic neuron proliferative progenitor cells obtained using the genes of the present
 20 invention can also be used to isolate genes specifically expressed in these cells. The cells are
 also thought to be useful in developing pharmaceuticals for neurodegenerative diseases such as
 Parkinson's disease. Since dopaminergic neuron proliferative progenitor cells before cell cycle
 exit are involved in early neuron formation, they are useful in elucidating the neuron maturation
 process, namely, identifying various factors involved in the maturation process. Elucidation of
 25 these factors is expected to contribute greatly to the treatment of neurodegenerative diseases.
 Moreover, maturation of these cells can be used as an index for screening substances that may
 regulate (inhibit or promote) the maturation process.

CLAIMS

1. A dopaminergic neuron proliferative progenitor cell marker polynucleotide probe comprising a sequence selected from the following nucleotide sequences (1) to (5):
 - 5 (1) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2;
 - (2) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - (3) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence encoding a sequence lacking a transmembrane domain in an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - 10 (4) a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2; and,
 - (5) a nucleotide sequence comprising at least 15 contiguous nucleotides selected from sequences of (1) to (4).
- 15 2. An antibody against a polypeptide selected from the following (1) to (6):
 - (1) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2;
 - (2) a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - (3) a polypeptide comprising an amino acid sequence lacking a transmembrane domain in an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - 20 (4) a polypeptide comprising an amino acid sequence with a deletion, insertion, substitution, or addition of one or more amino acids in an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4;
 - (5) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions with a sequence complementary to a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or 2; and,
 - (6) a polypeptide that is a fragment of a polypeptide of (1) to (5) comprising at least 8
 - 25 amino acid residues.
3. A method of selecting a dopaminergic neuron proliferative progenitor cell, wherein the method comprises the step of contacting the polynucleotide of claim 1 with a cell sample thought to comprise a dopaminergic neuron progenitor cell.
- 30 4. A method of selecting a dopaminergic neuron proliferative progenitor cell, wherein the method comprises the step of contacting the antibody of claim 2 with a cell sample thought to comprise a dopaminergic neuron progenitor cell.
- 35 5. A method of selecting a dopaminergic neuron proliferative progenitor cell comprising the steps of:

- (1) selecting a dopaminergic neuron progenitor cell using the method of selecting a dopamine-producing neuron progenitor cell of claim 3 or 4;
 - (2) culturing the progenitor cell selected in (1); and,
 - (3) screening the progenitor cell cultured in (2) using a postmitotic neuron marker.
- 5
6. A dopaminergic neuron proliferative progenitor cell prior to cell cycle exit selected using the method of any one of claims 3 to 5.
7. A method of isolating a gene specific to a dopaminergic neuron progenitor cell and a
- 10 gene specific to each maturation stage of the progenitor cell differentiating into a dopaminergic neuron, wherein the method comprises the step of detecting and isolating a gene specifically expressed in the progenitor cell of claim 6, or a cell differentiated, induced, or proliferated from the progenitor cell.
- 15 8. A method of screening using maturation as an index, wherein the method comprises the steps of contacting a test substance with the progenitor cell of claim 6, and detecting the differentiation or proliferation of the progenitor cell induced by the contact.

ABSTRACT

In neuron transplantation therapy, in terms of safety, it is preferable to use a cell population consisting only of a desired type of cells, and to use postmitotic neurons in
5 consideration to avoid the risk of tumorigenesis. Moreover, greater therapeutic effects would be expected through the use of earlier progenitor cells in consideration of post-transplantation viability, proper network formation ability, and such.

According to the present invention, Lrp4, a gene that is specifically expressed in dopaminergic neuron proliferative progenitor cells prior to cell cycle exit, was identified. The
10 use of Lrp4 expression in cells as an index allows for the isolation of cells suitable for transplantation therapy of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease in terms of safety, survival rate, and network formation ability.